



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
Câmpus de São José do Rio Preto

Antéia Olhiana Gouveia

Balanço material de uma planta industrial produtora de enzimas  
celulolíticas por cultivo em estado sólido

São José do Rio Preto  
2021

Antéia Olhiana Gouveia

Balanço material de uma planta industrial produtora de enzimas  
celulolíticas por cultivo em estado sólido

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq

Orientador: Prof. Dr. João Cláudio Thoméo  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Fernanda Perpétua  
Casciatori

São José do Rio Preto  
2021

|       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| G719b | <p>Gouveia, Antéia Olhiana</p> <p>Balanço material de uma planta industrial produtora de enzimas celulolíticas por cultivo em estado sólido / Antéia Olhiana Gouveia. -- São José do Rio Preto, 2021</p> <p>79 f. : il., tabs., fotos</p> <p>Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto</p> <p>Orientador: João Cláudio Thoméo</p> <p>Coorientadora: Fernanda Perpétua Casciatori</p> <p>1. Microbiologia industrial. 2. Enzimas de fungos – Aplicações industriais. 3. Cultivo em estado sólido. 4. Celulase. 5. Fluxograma de processo. I. Título.</p> |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Antéia Olhiana Gouveia

Balanço material de uma planta industrial produtora de enzimas  
celulolíticas por cultivo em estado sólido

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CNPq

Comissão Examinadora

Prof. Dr. João Cláudio Thoméo  
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto  
Orientador

Prof. Dr. Javier Telis Romero  
UNESP – Câmpus de São José do Rio Preto

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiane Sanchez Farinas  
EMBRAPA Instrumentação – São Carlos

São José do Rio Preto  
04 de março de 2021

*À Rubens e Noely, Beatriz, Ricardo e  
Nossa Senhora do Sagrado Coração.  
Dedido.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus Pai, Filho e Espírito Santo, por seu infinito amor e misericórdia para comigo e minha família em todos esses anos.

A minha mãe Santíssima, Nossa Senhora do Sagrado Coração, por ter me acolhido e restaurado a minha fé durante a minha caminhada até aqui.

Ao meu Santo Anjo, zeloso guardião, por sua proteção, intercessão e por guiar a minha caminhada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. João Cláudio Thoméo, por suas palavras e orientações, que para muito além desse projeto, me ensinaram a ver a vida de uma forma mais bela e valorosa.

À minha coorientadora, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Perpétua Casciotori, por sua orientação e disponibilidade em me ajudar, mesmo diante das ideias mais malucas.

Ao meu pai Rubens e à minha mãe Noely, pois sempre foi meu objetivo honrá-los e nunca os decepcionar; em todos os meus dias quero ser capaz de retribuir todo amor e esforço que me ajudaram a chegar até aqui.

À minha irmã, Beatriz, pela grande amizade que construímos em todos esses anos, por seu olhar esperançoso e determinado que sempre me lembraram o porquê da minha, da nossa, jornada.

Ao meu namorado, Ricardo, por nunca desistir de me fazer sorrir, ter acolhido as minhas falhas e me ajudado a ser melhor, e por ter permanecido ao meu lado em todos os dias.

Aos familiares e amigos que torceram e comemoraram junto cada vitória e conquista até aqui.

Aos meus colegas de pesquisa, laboratório e pós-graduação pelo tanto que, pacientemente, me ensinaram.

Aos membros da Comissão Examinadora de meu Exame Geral de Qualificação, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Fernanda Perpétua Casciotori e Prof. Dr. Vanildo Luiz del Bianchi, pelos comentários e sugestões que foram de grande valor para direcionamento das ideias propostas neste trabalho.

Aos membros da Comissão Examinadora de minha Defesa de Dissertação, Prof. Dr.

Javier Telis Romero, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Cristiane Sanchez Farinas, pela avaliação, discussão das ideias e direcionamento deste trabalho buscando um melhor fechamento do mesmo e prospecção de trabalhos futuros.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram para com a realização desta Dissertação de Mestrado.

Ao Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas (IBILCE) de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências de Alimentos (PPG- ECA), por proporcionarem oportunidade, apoio, suporte e infraestrutura necessários ao desenvolvimento desta pesquisa.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela bolsa de estudos e auxílio financeiro que possibilitou a dedicação integral ao programa de pós-graduação e a execução do estudo.

*“Que a tua vida não seja uma vida estéril. - Sê útil. - Deixa rasto.  
- Ilumina com o resplendor da tua fé e do teu amor. ”*

São Josemaria Escrivá (1999)

## RESUMO

Enzimas celulolíticas são fundamentais para o processo de produção de etanol de segunda geração (E2G). Todavia, o alto custo comercial destas enzimas requer novas vias de obtenção para tornar o E2G mais competitivo e, nesse sentido, o cultivo em estado sólido (CES) tem se mostrado uma opção promissora. Esse trabalho teve por objetivo estruturar e dimensionar em termos de balanço material um processo de produção industrial de enzimas celulolíticas por CES, cuja planta produtora estaria acoplada a uma planta convencional de produção de etanol. O processo de produção proposto é contínuo, mas comporta algumas etapas descontínuas, de modo que o fluxograma de processo e a cronologia das etapas buscou solucionar esta dificuldade. O microrganismo empregado foi o fungo termofílico *Myceliophthora thermophila* I-1D3b, cultivado em uma mistura de bagaço de cana e farelo de trigo (biomassa), na proporção 7:3 (p/p), a 45 °C por 96h. A base de cálculo deste projeto baseou-se em uma indústria sucroenergética de médio porte, com capacidade de processamento de 1,6 milhões de toneladas de cana por safra, e uma planta produtora de enzimas que processaria 12.000 toneladas de uma mistura de bagaço de cana e farelo de trigo (biomassa) por safra. Os principais gargalos operacionais foram identificados e soluções apontadas e, a partir dos cálculos de fluxo de massa, a quantidade e capacidade nominal dos equipamentos propostos foram estabelecidas, detalhando-se estes equipamentos sempre que possível. Definiu-se a forma de esterilização dos substratos, através da operação contínua em uma rosca sem fim com a injeção de vapor saturado, e o resfriamento, ocorrendo em um tambor rotativo pela admissão de ar seco resfriado. Estabeleceu-se um processo de CES para a produção de inóculo em biorreatores de bandeja. A mistura e inoculação da biomassa foram configuradas para ocorrer continuamente em tambor rotativo. O CES para a produção das enzimas foi proposto em biorreatores de leito empacotado, instalando-se uma rosca sem fim em seu interior para auxiliar no carregamento, descarregamento e estruturação da biomassa durante o cultivo, além de prover ar ao sistema. Por fim, a extração líquida das enzimas deu-se em tanque agitado, com a separação da biomassa sólida residual ocorrendo por filtração a vácuo em tambor rotativo. Projetada com um total de 20 biorreatores de leito empacotado de 150 m<sup>3</sup> cada, a planta produtora de enzimas celulolíticas apresentou uma atividade enzimática total de  $8,45 \times 10^{10}$  FPU por safra e um total de  $4,59 \times 10^5$  FPU por metro cúbico de extrato enzimático líquido obtido por

safra, cuja aplicação prevista atende cerca de 10 % da demanda de bagaço de cana disponível para hidrólise por safra.

**Palavras-chave:** Etanol de segunda geração. Celulases. Cultivo em estado sólido. Produção industrial. Balanço material. Fluxograma de processo.

## ABSTRACT

Cellulases are fundamental for the process of production of second-generation ethanol (2GE). Nevertheless, the high cost of commercial preparations asks for new routes of production of enzymes in order to make 2EG more competitive, and solid-state cultivation (SSC) has been shown to be a promising alternative for such purpose. This work aimed to propose a structure and the material flow of an industrial process of production of cellulases by SSC, which would be coupled with a conventional ethanol production plant and to a 2EG process. The proposed process is continuous, even though some batch steps are forecasted and the process integration is troublesome. The microbe was the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila* I-1D3b, which is cultivated in a mixture of sugarcane bagasse and wheat bran at a proportion 7:3 (w/w), 45 °C and 96h. This process was based in a medium-size sucroenergetic industry, which process 1.6 million tons of cane per crop. The main bottlenecks were identified and possible solutions proposed and, from the mass balances, the quantity and nominal capacity of the equipments were determined, and details of these equipments were presented when possible. Continual sterilization was used for the biomass, using direct flow of saturated steam in an endless thread apparatus, followed by refrigeration in a rotating drum. The inoculum was proposed to be produced by SSC in tray bioreactors. The mixture sugarcane bagasse-wheat bran would be mixed and inoculated in a rotating drum. The production of enzymes would take place by SSC in packed-bed bioreactors and an endless thread would be installed in it for the charge and discharge of biomass and to provide physical structure and air to the cultivation medium. Water would be added to the cultivated biomass to extract the enzymes in an agitated vessel, and the enzymatic extract would be separated from the biomass in a vacuum rotating drum. The enzymes would be produced in 20 bioreactors of 150m<sup>3</sup> each, and the total enzyme activity produced would be of 8.45 10<sup>10</sup> FPU per crop and 4.59 10<sup>5</sup> FPU/m<sup>3</sup> of enzymatic extract, whose expected application provides 10 % of the demand for sugarcane bagasse available for hydrolysis per crop.

**Keywords:** Second-generation ethanol. Cellulases. Solid-state cultivation. Industrial production. Material balance. Process flowchart.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                                                                                                                                                                                           |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1 - Diagrama simplificado da produção convencional de E1G no Brasil. ....                                                                                                          | 18 |
| Figura 2 - Usina Colombo, unidade de Palestina, com capacidade de moagem de 2 milhões de tonelada por safra. ....                                                                         | 20 |
| Figura 3 - Diagrama simplificado da produção de E2G no Brasil. ....                                                                                                                       | 21 |
| Figura 4 - Representação esquemática da ação das celulasas sobre a celulose. ....                                                                                                         | 23 |
| Figura 5 - Conjunto de biorreatores para CES: a) tambor de parede rotativa; b) tambor de pás rotativas; c) bandeja com fundo cego; d) bandeja com fundo de tela; e) leito empacotado..... | 25 |
| Figura 6 - Aspecto do substrato (biomassa) após 96 horas de cultivo. ....                                                                                                                 | 28 |
| Figura 7 - Biorreatores de leito empacotado usados nos ensaios do Grupo de Pesquisa em Bioenergia do IBILCE/UNESP: (a) escala de bancada e (b) escala piloto. ....                        | 28 |
| Figura 8 - Fluxograma do processo de produção de enzimas fibrolíticas por cultivo em estado sólido. ....                                                                                  | 33 |
| Figura 9 - Diagrama simplificado das etapas de produção da PPE atual.....                                                                                                                 | 37 |
| Figura 10 - Fluxograma de processo da proposição atual da PPE por CES. ....                                                                                                               | 45 |
| Figura 11 - Fluxograma de processo da etapa de produção do inóculo da PPE .....                                                                                                           | 46 |
| Figura 12 - Fluxograma de processo da etapa de preparo do substrato da PPE.....                                                                                                           | 47 |
| Figura 13 - Fluxograma de processo da etapa de mistura e inoculação da PPE. ....                                                                                                          | 52 |
| Figura 14 - Fluxograma de processo da etapa de cultivo em estado sólido para produção de celulasas da PPE. ....                                                                           | 53 |
| Figura 15 - Fluxograma de processo da etapa de extração da PPE. ....                                                                                                                      | 55 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1 - Condições operacionais do CES em biorreatores de leito empacotado em escala de bancada. ....                                       | 31 |
| Tabela 2 - Parâmetros de operação para uma usina sucroenergética brasileira de médio porte. ....                                              | 32 |
| Tabela 3 - Dimensão e quantidade de equipamento para o processo de produção de enzimas por CES, com base na disponibilidade do substrato..... | 35 |
| Tabela 4 - Parâmetros de umidade adotados no balanço material. ....                                                                           | 37 |
| Tabela 5 - Balanço material global da nova proposição para PPE.....                                                                           | 41 |
| Tabela 6 - Equipamentos da etapa de preparo do substrato. ....                                                                                | 49 |
| Tabela 7 - Equipamentos para etapa de produção do inóculo. ....                                                                               | 51 |
| Tabela 8 - Equipamentos para etapa de mistura e inoculação.....                                                                               | 52 |
| Tabela 9 - Equipamentos para etapa de cultivo em estado sólido para produção de celulasas. ....                                               | 54 |
| Tabela 10 - Equipamentos para etapa de extração.....                                                                                          | 56 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|                   |                                                     |
|-------------------|-----------------------------------------------------|
| <b>ART</b>        | Açúcares redutores totais                           |
| <b>CES</b>        | Cultivo em estado sólido                            |
| <b>CSm</b>        | Cultivo submerso                                    |
| <b>E1G</b>        | Etanol de primeira geração                          |
| <b>E2G</b>        | Etanol de segunda geração                           |
| <b>FPU/g.s.s.</b> | <i>Filter Paper Unit</i> / gramas de substrato seco |
| <b>HTST</b>       | <i>High Temperature Short Time</i>                  |
| <b>PPE</b>        | Planta piloto produtora de enzimas                  |
| <b>SIM3</b>       | Terceiro cenário industrial                         |
| <b>TIR</b>        | Taxa interna de retorno                             |
| <b>1G</b>         | Inóculo de primeira geração                         |
| <b>2G</b>         | Inóculo de segunda geração                          |
| <b>3G</b>         | Inóculo de terceira geração                         |

## SUMÁRIO

|          |                                                                                                                |           |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b>                                                                                              | <b>14</b> |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS</b>                                                                                               | <b>17</b> |
| <b>3</b> | <b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>                                                                                   | <b>18</b> |
| 3.1      | Produção de etanol de primeira geração a partir do caldo de cana-de-açúcar                                     | 18        |
| 3.2      | Produção de etanol de segunda geração por rota bioquímica                                                      | 20        |
| 3.3      | Enzimas celulolíticas                                                                                          | 22        |
| 3.4      | Produção de enzimas celulolíticas em biorreatores de leito empacotado                                          | 25        |
| <b>4</b> | <b>PROCESSO DE PRODUÇÃO INDUSTRIAL IN-HOUSE DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS: PROPOSIÇÃO DE MENDES, ATALA E THOMÉO</b> | <b>30</b> |
| <b>5</b> | <b>PROCESSO DE PRODUÇÃO INDUSTRIAL IN-HOUSE DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS: PROPOSIÇÃO ATUAL</b>                     | <b>36</b> |
| 5.1      | Balanço material global                                                                                        | 36        |
| 5.2      | Fluxograma de processo e descrição das etapas                                                                  | 43        |
| 5.2.1    | Preparo do substrato                                                                                           | 47        |
| 5.2.2    | Produção do inóculo                                                                                            | 49        |
| 5.2.3    | Mistura e inoculação                                                                                           | 51        |
| 5.2.4    | Cultivo em estado sólido para produção de celulasas                                                            | 53        |
| 5.2.5    | Extração                                                                                                       | 55        |
| <b>6</b> | <b>DISCUSSÕES SOBRE A PROPOSIÇÃO ATUAL</b>                                                                     | <b>57</b> |
| <b>7</b> | <b>CONCLUSÃO</b>                                                                                               | <b>64</b> |
| <b>8</b> | <b>TRABALHOS FUTUROS</b>                                                                                       | <b>66</b> |
|          | <b>REFERÊNCIAS</b>                                                                                             | <b>67</b> |
|          | <b>APÊNDICE A – Balanço material para as etapas da PPE</b>                                                     | <b>75</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização de material lignocelulósico proveniente de resíduos agroindustriais é um meio sustentável para aumentar a produtividade do etanol produzido no Brasil e ampliar o percentual de fontes renováveis na matriz energética brasileira (PIROTA; DELABONA; FARINAS, 2014), contribuindo para segurança e independência energética nacional (MILANEZ et al., 2015). O grande volume de material lignocelulósico disponível nas usinas sucroenergéticas brasileiras, bagaço e palha de cana de açúcar, ajuda na viabilização econômica desse processo e incentiva novos investimentos em pesquisas (MARQUES, 2018). Para construção de uma trajetória mais competitiva, nos últimos anos tem-se voltado a atenção para outro importante insumo presente na cadeia de produção do etanol de segunda geração (E2G): as enzimas celulolíticas necessárias à hidrólise do material lignocelulósico para liberar os açúcares fermentescíveis que posteriormente serão convertidos em etanol (KARMAKAR; RAY, 2011; KUHAD et al., 2016; VASCONCELOS, 2019).

A via enzimática, como é chamada, é preferível ao método químico por não produzir resíduos tóxicos e ser ambientalmente mais amigável. No entanto, os coquetéis enzimáticos comerciais representam o terceiro maior custo operacional na produção do E2G, ficando atrás apenas do custo de capital e de matéria-prima (STEPHENS et al., 2010; NOVELLO et al., 2014; MENDES; ATALA; THOMÉO, 2017).

Da mesma forma como ocorrem com outras enzimas, a produção industrial de celulasas e sua distribuição mundial ainda é controlada por grandes empresas internacionais (FONSECA; PARREIRAS; MURAKAMI, 2020). Uma alternativa a esse cenário é o desenvolvimento de uma produção local dessas enzimas (*in-house*, na denominação em inglês), cuja a produção conjugada à planta de bioetanol possibilitaria o compartilhamento de insumos, instalações e pessoal, reduzindo seus custos de produção (MENDES; ATALA; THOMÉO, 2017; PEREZ; CASCIATORI; THOMÉO, 2020; SIQUEIRA et al., 2020). No intuito de reduzir ainda mais os custos das enzimas, o cultivo em estado sólido (CES) é vantajoso, pois pode utilizar resíduos agroindustriais como substrato aos microrganismos, em geral fungos, e tem menores requisitos sanitários que o cultivo submerso (RAIMBAULT, 1998; HÖLKER; LENZ, 2005) favorecendo a produção *in-house*.

O CES de fungos termófilos em biorreatores de leito empacotado para a produção de celulasas tem se mostrado promissor, como mostram os trabalhos do

Grupo de Bioenergia do IBILCE/UNESP (ZANELATO et al., 2012; CASCIATORI et al., 2014; CASCIATORI et al., 2015; CASCIATORI et al., 2016; CASCIATORI; THOMÉO, 2018; PEREZ; CASCIATORI; THOMÉO, 2019; TADA; AGUDELO; THOMÉO, 2019; FRASSATTO et al., 2020; PEREZ; CASCIATORI; THOMÉO, 2020), que obteve celulases com altas atividades a partir do cultivo em substratos como bagaço de cana de açúcar, palha de cana de açúcar e farelo de trigo. Os extratos enzimáticos obtidos mostraram-se eficientes na sacarificação de bagaço de cana pré-tratado (CASCIATORI et al., 2015b; FRASSATTO et al., 2020). No entanto, não se tem notícias da produção industrial destas enzimas por meio de CES. Mendes et al. (2017) fez uma análise econômica sobre a viabilidade de se produzir industrialmente essas enzimas celulolíticas empregando-se o fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b. Para tanto, estes autores propuseram uma planta produtora de estrutura simplificada, compartilhando insumos, utilidades, equipamentos e pessoal técnico com as plantas de E1G e E2G como estratégia para redução de custos. Os indicadores econômicos obtidos foram compatíveis com os praticados pelo setor, dentre os quais um *payback* de 10 anos.

Todavia, o trabalho de Mendes et al. (2017) não detalha aspectos essenciais do processo, tais como as etapas de preparo do inóculo e de inoculação, transporte e esterilização do substrato, carga e descarga dos biorreatores de leito empacotado, extração líquida das enzimas, e o direcionamento dos resíduos sólidos, para que o aumento de escala e futura implantação da produção industrial de enzimas por CES possa ser encarada como uma possibilidade real.

Nesse contexto, esta dissertação propõe elaboração de um processo industrial de produção dessas enzimas, acoplado a uma planta convencional produtora de E1G e E2G, apresentando soluções para os gargalos industriais supracitados, assim como o dimensionamento em termos de balanço material do processo tido como economicamente viável.

Para esse fim, os capítulos desta dissertação foram organizados da seguinte maneira: o Capítulo 2 identifica os objetivos gerais e específicos do trabalho; o Capítulo 3 apresenta a revisão bibliográfica englobando a produção de etanol E1G a partir do caldo de cana-de-açúcar, a produção de etanol E2G por rota bioquímica, a ação das enzimas celulolíticas, bem como a produção dessas em biorreatores de leito empacotado; o Capítulo 4 é responsável por apresentar a proposição de Mendes, Atala e Thoméo para uma planta piloto produtora de enzimas (PPE) por CES

adjacente às plantas de produção de E1G e E2G, abordando as condições e parâmetros operacionais adotados pelos pesquisadores, assim como o fluxograma de processo desenvolvido pelos mesmos; o Capítulo 5, por sua vez, apresenta o balanço material global elaborado para a proposição atual da PPE, assim como a descrição do fluxograma de processo resultante; o Capítulo 6 traz uma discussão sobre os equipamentos e modo de operação selecionados para a proposta atual; por fim, os Capítulo 7 e 8 expõem as conclusões e sugestões para trabalhos futuros.

## 2 OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo geral a estruturação e detalhamento de um processo de produção de enzimas celulolíticas por cultivo em estado sólido em biorreatores de leito empacotado integrado a produção tradicional de etanol de primeira e segunda geração, bem como apresentar o balanço material das principais correntes envolvidas.

Os objetivos específicos deste estudo foram:

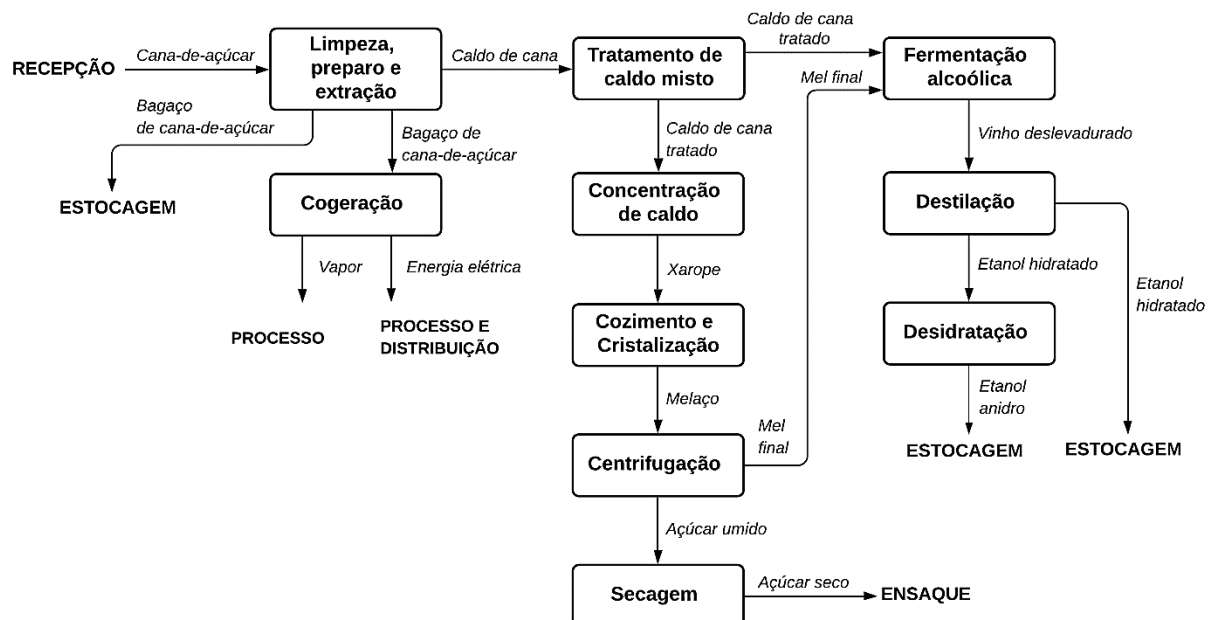
- ✓ Discutir e propor soluções para os gargalos industriais, inerentes a ampliação de escala desse processo, encontrados nas operações de esterilização e transporte dos substratos, preparo do inóculo e inoculação, carga e descarga dos biorreatores de leito empacotado, cultivo em estado sólido, extração líquida das enzimas, e no direcionamento dos resíduos sólidos;
- ✓ Elaborar uma nova proposta de fluxograma de processo para produção industrial dessas enzimas;
- ✓ Dimensionar, a partir de um balanço material, os principais equipamentos envolvidos.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Produção de etanol de primeira geração a partir do caldo de cana-de-açúcar

No Brasil, cerca de 95% de todo o etanol produzido é proveniente processamento industrial da cana-de-açúcar, essa indústria é uma das principais atividades produtivas da economia brasileira (ALBARELLI; ENSINAS; SILVA, 2014; CONAB, 2020), sendo responsável por 18% de toda a oferta nacional de energia, 8,4% de toda energia elétrica ofertada no país (EPE, 2020), e 17,3% de toda produção global de açúcar (NACHILUK, 2020). Das mais de 400 unidades produtivas cadastradas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil mais de 70% eram usinas integradas com produção conjunta de açúcar, etanol e energia elétrica (CONAB, 2013). A Figura 1 apresenta as principais corrente materiais e as operações encontrados na produção convencional de etanol de primeira geração (E1G) no Brasil.

Figura 1 - Diagrama simplificado da produção convencional de E1G no Brasil.



Fonte: elaborada pela autora.

A cana-de-açúcar que chega a usina é encaminhada para área de limpeza, preparo e extração, neste setor parte das impurezas arrastadas no processo de colheita são retiradas; a cana limpa é distribuída e nivelada, em seguida as células da cana são esmagadas com o intuito de facilitar a extração dos açúcares na etapa seguinte (FURLAN, 2012). A extração desses açúcares pode ser realizada tanto pelo emprego de moendas quanto difusores, nos dois casos, o bagaço gerado segue para as caldeiras, onde é utilizado como matéria prima para produção de vapor e energia elétrica (DIAS, 2008).

O caldo de cana obtido na extração é encaminhado ao tratamento para remoção das partículas em suspensão, areia e bagacilho, assim como impurezas na forma solúvel, coloidal e insolúvel (FURLAN, 2012). Uma vez tratado, o caldo é direcionado para dois processos distintos: produção de açúcar e, ou etanol de primeira geração. Na produção convencional de etanol utilizam-se como matérias-primas o caldo de cana tratado e o mel final proveniente da etapa de centrifugação do açúcar, com elas é preparado o mosto deve conter sua composição cerca 30% em massa de leveduras (MENDES, 2015).

A etapa seguinte consiste na fermentação alcoólica do mosto, normalmente em batelada alimentada até a obtenção de um vinho levedurado, possuindo uma concentração de etanol entre 8 a 12% que é encaminhado à centrifugação para separação do vinho e da massa de leveduras, esta é reciclada e reenviada as dornas de fermentação, enquanto o vinho deslevedurado é enviado às colunas de destilação para concentração do etanol (FURLAN, 2012). Das colunas de destilação obtém-se etanol hidratado até seu ponto azeotrópico, 95 °GL, e posteriormente, após um processo de desidratação, feito em peneiras moleculares ou por extração líquido-líquido, produz-se etanol anidro (MENDES, 2015). Na Figura 2 pode-se observar um exemplo de uma instalação industrial de uma usina sucroenergética brasileira de médio porte.

Figura 2 - Usina Colombo, unidade de Palestina, com capacidade de moagem de 2 milhões de tonelada por safra.

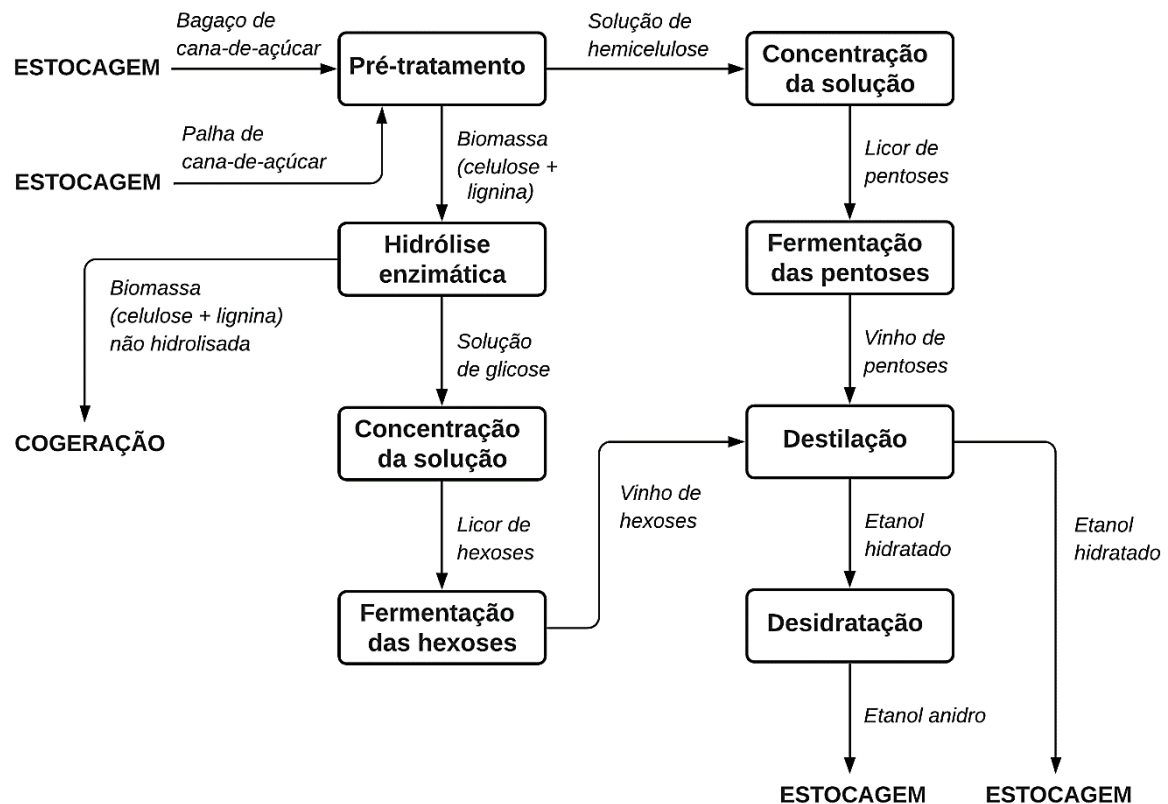


Fonte: (PAVANI, 2018).

### 3.2 Produção de etanol de segunda geração por rota bioquímica

A produção de etanol de segunda geração (E2G) ocorre a partir de materiais lignocelulósicos provenientes de resíduos agrícolas e industriais, tais como: palha de milho, colmos de bambu, palha de trigo, palha e bagaço de cana-de-açúcar, talos de algodão, palha e casca de arroz (ADITIYA et al., 2016). No Brasil localiza-se duas das três plantas industriais produtoras de E2G existentes no mundo, ambas utilizam como matéria-prima resíduos que sobram da produção de E1G: palha e bagaço da cana-de-açúcar (VASCONCELOS, 2019). O processo de produção de ambas é por rota bioquímica, que é aquela baseada na hidrólise enzimática do material sólido e fermentação alcoólica dos açúcares liberados (LORENZI; DE ANDRADE, 2019). A Figura 3 apresenta um diagrama simplificado da produção de E2G.

Figura 3 - Diagrama simplificado da produção de E2G no Brasil.



Fonte: elaborado pela autora.

O processo tem início com o pré-tratamento, onde a matéria-prima é tratada fisicamente e quimicamente para limpar o material e expor suas fibras. Na configuração apresentada, duas linhas materiais são provenientes dessa etapa: uma fração sólida, contendo celulose e lignina, e outra líquida, contendo hemicelulose, essas duas linhas seguem caminhos distintos para um mesmo fim: a produção de E2G (MILANEZ et al., 2015). A solução de hemicelulose é concentrada e o licor de pentoses (5C) obtido é encaminhado a fermentação e posteriormente enviado a destilaria; por sua vez, a biomassa, fração sólida, é submetida a um processo de hidrólise, onde as estruturas moleculares da celulose contidas nesse material serão decompostas a fim de liberar os açúcares fermentescíveis, glicose (6C), nelas contidas. Em seguida, o material hidrolisado é concentrado, fermentado, e encaminhado para destilaria (LORENZI; DE ANDRADE, 2019).

Na rota enzimática, empregam-se enzimas para realizar a hidrólise do material. Por ocorrer em condições mais brandas, menor gasto energético é requerido, dessa

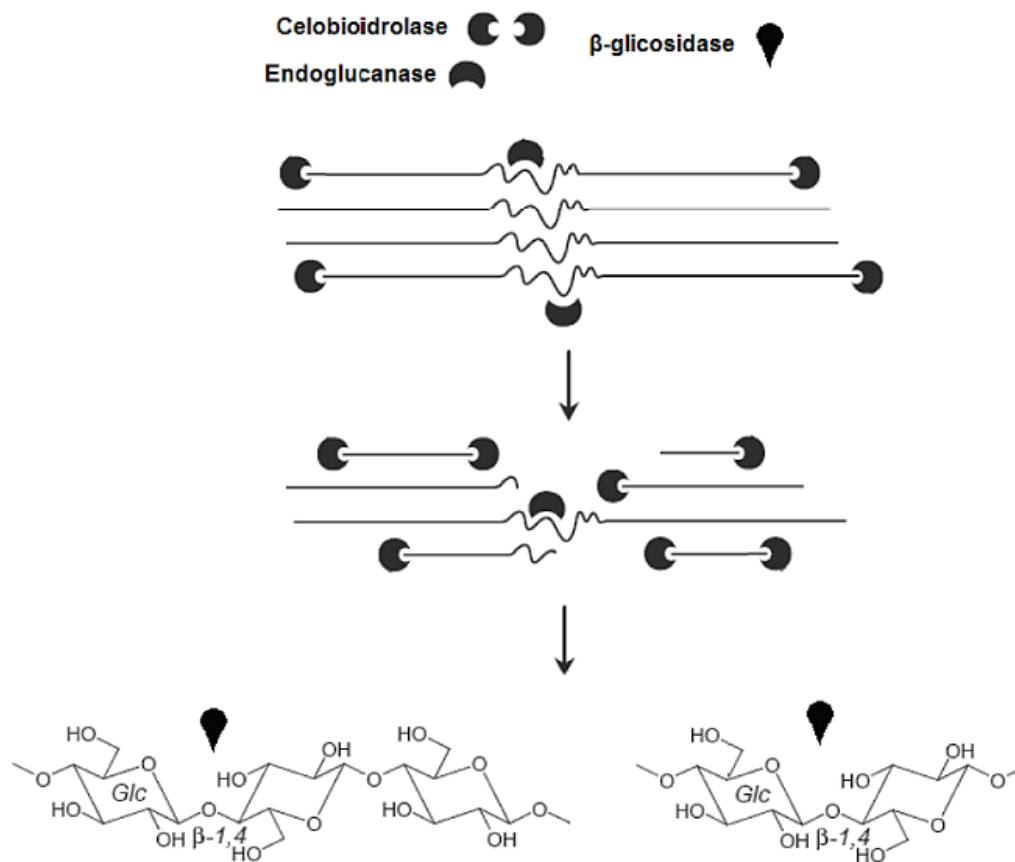
forma, esse processo é vantajoso se comparado com a hidrólise química, que emprega ácidos ou bases, concentrados ou diluídos, para desestruturação das fibras do material lignocelulósico, uma vez que não há produção de resíduos tóxicos para o meio ambiente, ou tóxicos para os microrganismos que realizam a fermentação, e não requer assim processos lentos e caros de recuperação de produto (FURLAN, 2012).

Apesar das vantagens apresentadas, produzir essas enzimas a um menor custo é um dos principais entraves e desafios tecnológicos desse setor (IPEA, 2016). No mundo todo, poucas são as empresas que produzem comercialmente essas enzimas, e em consequência, a obtenção destas pelas usinas de bioetanol acarreta em um alto custo operacional, uma vez que há a necessidade de importar essa tecnologia ainda hoje (STEPHENS et al., 2010; NOVELLO et al., 2014; LORENZI; DE ANDRADE, 2019). Ainda que, em termos econômicos a produção de E2G não seja praticável para valores baixos do barril de petróleo, não se trata apenas de produzir combustível a baixo custo, mas de alcançar o domínio estratégico da tecnologia de produção de enzimas fibrolíticas. Esses fatos combinados, justificam e animam o setor de pesquisa e desenvolvimento, privado e público, na busca por aprimoramento de processos de produção e novas enzimas (IPEA, 2016).

### **3.3 Enzimas celulolíticas**

Enzimas celulolíticas são um complexo de três principais tipos de celulase: endoglucanases, exoglucanases e  $\beta$ -glicosidase, que atuam sinergicamente para produzir oligossacarídeos e glicose. Endoglucanases atuam primeiro nas fibras de celulose em regiões amorfas e liberam celo-oligossacarídeos e pequenas fibras com extremidades redutoras e não redutoras livres, por sua vez as exoglucanases quebram essas pequenas fibras de celulose e os celo-oligossacarídeos maiores liberando a celobioses, até que finalmente as  $\beta$ -glicosidase hidrolisam essas para obtenção de glicose (NIGAM; PANDEY, 2009; QUIROZ-CASTAÑEDA; FOLCH-MALLOL, 2013; CASCIATORI, 2015). A Figura 4 mostra a ação de diferentes componentes da celulase agindo sinergicamente para hidrolisar a celulose.

Figura 4 - Representação esquemática da ação das celulasas sobre a celulose.



Fonte: extraído e adaptado de (SANDGREN; STÅHLBERG; MITCHINSON, 2005).

Microrganismos, como fungo e bactérias, desenvolveram a capacidade modificar e acessar a biomassa lignocelulósica pela produção desse conjunto de enzimas a fim de atender as suas necessidades metabólicas. Essa capacidade inerente a estes seres, mostrou-se um meio natural e de baixo custo para preparação e otimização de produtos em diversos setores, como papel e celulose, têxtil, detergentes e biocombustíveis, fazendo das celulasas a terceira mais importante classe de enzimas utilizadas na indústria (BON et al., 2013). Todavia, assim como acontece com outras enzimas, a sua produção de forma comercial encontra-se restrita a poucas empresas no mundo todo, sendo 74% do mercado dominado apenas por três delas: Novozymes (47%), DuPont (21%) e DSM (6%) (MENDES; ATALA; THOMÉO, 2017; LORENZI; DE ANDRADE, 2019).

Ainda hoje, o cultivo submerso (CSm) tem sido o método fermentativo mais utilizado pelas indústrias de bioprodutos para produção das celulasas (CASCIATORI,

2015a). O meio homogêneo constituído por 90 a 99% de água em massa total do material, facilita as transferências de massa, calor e de oxigênio, e por esse motivo apresenta vantagens quanto ao controle dos parâmetros físico-químicos do processo, além de contribuir para uma melhor absorção de nutrientes pelo microrganismo e facilitar a recuperação de metabólitos (NIGAM; PANDEY, 2009; FLORENCIO; BADINO; FARINAS, 2017). Entretanto, microrganismos aeróbios, em seu habitat natural, crescem e utilizam a celulose de forma que se assemelha ao cultivo em estado sólido (CES) do que com uma cultura líquida (NIGAM; PANDEY, 2009).

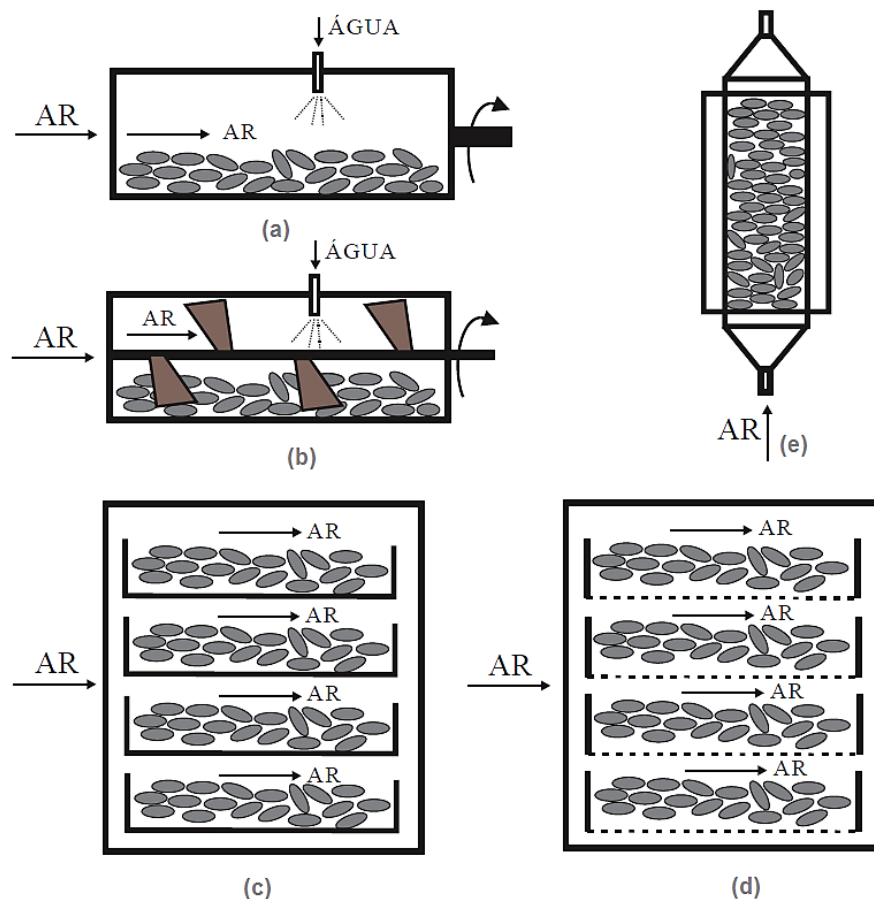
O cultivo em estado sólido (CES) pode ser definido como o crescimento de microrganismos sobre partículas sólidas úmidas, de forma que o espaço entre as partículas contém uma fase gasosa contínua e a água está infiltrada nas partículas ou forma um fino filme sobre elas, o conteúdo da água da matriz porosa deve ser suficientemente alto para possibilitar adequadas condições para o desenvolvimento microbiano, sem que haja água suficiente tornar a mistura fluida (NIGAM; PANDEY, 2009; CASCIATORI, 2015; DE OLIVEIRA et al., 2020). Devido à menor atividade de água nesse sistema, em comparação com o CSm, minimizam-se as chances de contaminação e a necessidade de um controle rigoroso do processo. Outras vantagens do CES são: ausência de produtos químicos anti-espuma durante o cultivo; matéria-prima utilizada é proveniente de fontes naturais, muitas vezes resíduos agroindustriais de menor custo; microflora nativa do substrato pode ser utilizada como inóculo; a porosidade do material facilita a aeração; possibilidade de utilização direta dos materiais fermentados; e a alta concentração de produtos que facilita a extração (WEBB; MANAN, 2017).

Ainda assim, apesar do seu excelente potencial de aplicação, o CES ainda não está totalmente estabelecido como uma alternativa industrial de sucesso, sobretudo, devido à falta de equipamentos industriais disponíveis e otimizados. Além disso, o CSm já está acessível em nível industrial para diversos produtos, tornando mais difícil para o CES competir com resultados semelhantes na maioria dos casos. A solução para este impasse depende, essencialmente, de estudos de engenharia, que incluam modelagem, simulação e experimentação, variando de testes em escala de frasco a escalas de bancada e piloto, com foco tanto no desenvolvimento de biorreatores quanto na proposição de novas estratégias para realizar operações tanto *up* quanto *downstream* (DE OLIVEIRA et al., 2020).

### 3.4 Produção de enzimas celulolíticas em biorreatores de leito empacotado

O projeto do biorreator e as estratégias operacionais para manter um ambiente propício para desenvolvimento do microrganismo influenciam o desempenho de todo o processo CES (WEBB; MANAN, 2017). Os projetos para esses biorreatores podem ser classificados, sobretudo, entre os de leito fixo e de leito móvel, sendo os tipos mais comuns são apresentados na Figura 5. Detalhes desses e outro biorreatores para CES podem ser encontrados em (MITCHELL; KRIEGER; BEROVIČ, 2006).

Figura 5 - Conjunto de biorreatores para CES: a) tambor de parede rotativa; b) tambor de pás rotativas; c) bandeja com fundo cego; d) bandeja com fundo de tela; e) leito empacotado



Fonte: extraído e adaptado de (CASCIATORI, 2015a).

Segundo Casciatori (2015a), o tambor rotativo é a configuração que melhor representa os biorreatores de leito móvel, existindo duas alternativas para movimentação do meio de cultivo: girando-se a parede, na qual estão instalados

defletores que elevam as partículas (Figura 5a), e girando-se um eixo interno dotado de pás (Figura 5b). A agitação serve para mistura das partículas, visando principalmente à uniformização das temperaturas e umidades, mas é limitada a fungos de hifas septadas, sendo necessário, ainda nestes casos, estudos específicos para medir a tolerância do fungo ao cisalhamento (CASCIATORI, 2015a; WEBB; MANAN, 2017).

Por sua vez, os biorreatores de leito fixo podem ser subdivididos entre os de bandeja e os de leito empacotado. Esses modelos são amplamente usados no CES devido ao seu projeto simples e baixas exigências de manutenção; além disso, a inexistência de agitação faz esses biorreatores ideais para microrganismos sensíveis às tensões de cisalhamento (CASCIATORI, 2015a).

O uso de bandejas é o sistema mais antigo e simples, historicamente, usado para o CES (WEBB; MANAN, 2017). Nesse tipo de biorreator, as bandejas são colocadas em câmaras de cultivo, onde se controlam temperatura e umidade relativa (CASCIATORI, 2015a). Para o cultivo, o substrato deve ser acomodado em finas camadas na parte inferior da bandeja, que pode ser fechada (Figura 5c) ou perfurada com tela (Figura 5d) a fim de permitir uma melhor aeração e evitar o superaquecimento (WEBB; MANAN, 2017). No oriente, o emprego desse biorreator é muito disseminado para produção do *koji*, um dos precursores do molho de soja.

Nos biorreatores de leito empacotado, ar é soprado forçadamente através de um leito cilíndrico, onde se encontra empacotado o substrato previamente inoculado e umidificado (CASCIATORI, 2015a). Para um controle de processo eficiente, sua estrutura externa é circundada por uma camisa, através da qual circula água na temperatura ideal para o desenvolvimento do fungo, e internamente ar úmido saturado é continuamente soprado através de um orifício na base do biorreator fornecendo oxigênio e retirando gás carbônico ao longo do cultivo, promovendo também a remoção do excesso de calor metabólico gerado (CASCIATORI, 2015a; WEBB; MANAN, 2017). Por toda a sua extensão, placas perfuradas localizadas entre os flanges das seções que compõem o biorreator, fazem a sustentação do substrato durante o cultivo.

No CES, os microrganismos que mais se adaptam a esse processo são os fungos filamentosos, e dentre eles, os fungos termófilos destacam-se pela produção de enzimas termoestáveis. Estas são interessantes para aplicações industriais que operam com temperaturas mais elevadas e por isso necessitam de enzimas

termicamente mais estáveis, nesses processos o risco de contaminação por microrganismos mesófilos, que são a maioria em um ambiente industrial, significativamente reduzido (GOMES et al., 2007).

O fungo *Myceliophthora thermophila* é um exemplar termofílico isolado do solo ou de material vegetal em decomposição, onde contribuem com a deterioração de polissacarídeos presentes nas estruturas das plantas (CASCIATORI, 2015a). A linhagem desse fungo identificada como I-1D3b, isolada a partir de pilhas de compostagem, tem sido utilizada pelo Grupo de Pesquisa em Bioenergia do IBILCE/UNESP ao longo de uma década para obtenção de celulases por CES em escala de frascos, biorreatores de bancada de leito fixo e rotativo, e nos últimos anos, em biorreator de leito empacotado em escala piloto (CASCIATORI et al., 2016; PEREZ; CASCIATORI; THOMÉO, 2020). Os estudos realizados por Zanelato et al. (2012) e Casciatori (2015a), utilizando bagaço da cana-de-açúcar e farelo de trigo como substrato do fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b em biorreatores de leito fixo, apresentam como resultado uma série de informações operacionais importantes para a continuidade e aprimoramentos desse tipo de cultivo.

O uso do farelo de trigo e do bagaço de cana, baseia-se na experiência anterior do grupo e na disponibilidade desses materiais. O farelo de trigo apresenta um cálculo adequado dos elementos nitrogênio, carbono e fósforo, juntamente com outros micronutriente e por isso atua como indutor do crescimento inicial nesse processo (MENDES; ATALA; THOMÉO, 2017). Já o bagaço de cana atua na indução da produção das enzimas celulolíticas devido ao maior conteúdo de celulose nele presente (CASCIATORI et al., 2015a). Além disso, ambos são materiais que se encontram amplamente disponíveis no Brasil, o que os favorece para esse tipo de aplicação.

A biomassa (bagaço de cana e farelo de trigo) cultivada após ser retirada do biorreator é mostrada na Figura 6, pode-se observar que o crescimento micelial do fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b modifica as estruturas dos poros (espaços inter-partículas) da biomassa cultivada, resultando em um micélio denso responsável pela restrição do fluxo de ar e água nos espaços vazios (TADA; AGUDELO; THOMÉO, 2019). A forma micelar desse fungo também restringe sua tolerância ao cisalhamento, nesse sentido, o biorreator de leito empacotado mostrou-se favorável ao desenvolvimento do fungo e a produção de enzimas celulolíticas (CASCIATORI,

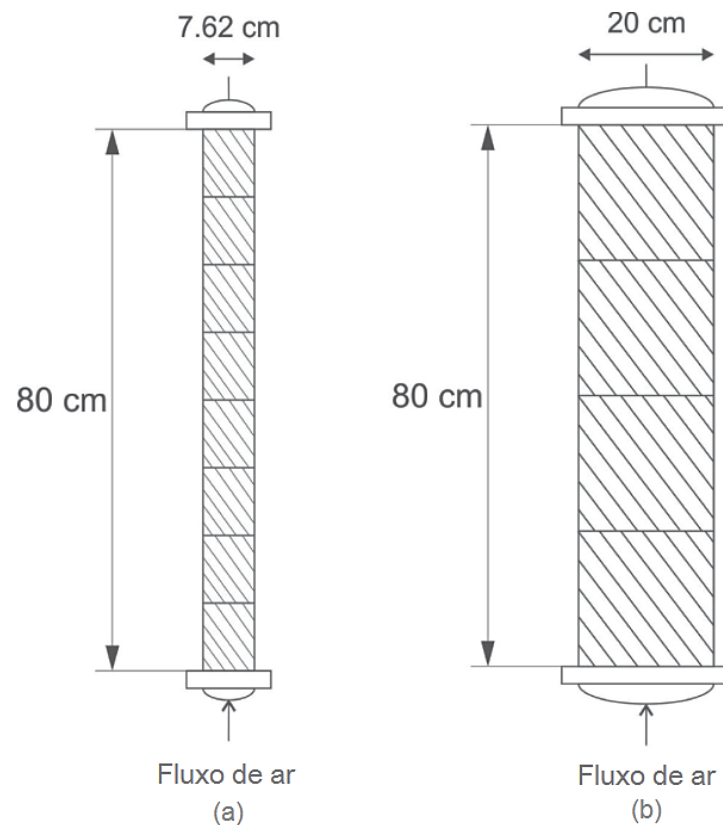
2015a). A Figura 7 ilustra duas configurações possíveis dos biorreatores de leito empacotado utilizados nos ensaios de Zanelato et al. (2012) e Casciotori (2015a).

Figura 6 - Aspecto do substrato (biomassa) após 96 horas de cultivo.



Fonte: (MENDES, 2015).

Figura 7 - Biorreatores de leito empacotado usados nos ensaios do Grupo de Pesquisa em Bioenergia do IBILCE/UNESP: (a) escala de bancada e (b) escala piloto.



Fonte: extraído e adaptado de (PEREZ; CASCIATORI; THOMÉO, 2019).

Para o aumento de escala dessa classe de biorreatores, um dos principais problemas de operação é a remoção deficiente do calor gerado metabolicamente como consequência de fatores associados ao substrato, ao microrganismo e a operação do sistema; no CES, as baixas vazões de escoamento de ar comumente empregadas dificultam a dispersão do calor metabólico, e a segregação de umidade no meio poroso ao longo do cultivo, consequente dos gradientes de temperatura, tem efeitos diretos sobre o crescimento fúngico e a produção de metabólitos (CASCIATORI; THOMÉO, 2018). Alternativas para o contorno dessas dificuldades foram testadas pelos autores em Perez et al. (2020). Nesse estudo, a aplicação de um biorreator em escala piloto contendo um tubo interno perfurado colocado ao longo do meio de cultivo, resultou em atividades enzimáticas mais altas do que o a estratégia de ponta a ponta aplicada até então nos experimentos do Grupo de Pesquisa. Tais resultados são úteis para construção de biorreatores de leito empacotado de maior dimensão, ainda que hajam aprimoramentos a serem feitos no dispositivo de inserção de ar (PEREZ; CASCIATORI; THOMÉO, 2020).

#### 4 PROCESSO DE PRODUÇÃO INDUSTRIAL IN-HOUSE DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS: PROPOSIÇÃO DE MENDES, ATALA E THOMÉO

O modelo de produção *in house* tem sido apontado como uma alternativa para redução dos custos das enzimas celulolíticas, uma vez que se adapta ao conceito de economia circular e permite o compartilhamento de pessoal, serviços e utilidades entre o E1G, o E2G e a planta produtora de enzimas. Comum aos três processos é o bagaço de cana, expandindo-se assim o conceito de biorefinarias geradoras de biomoléculas de maior valor agregado (FARINAS; FLORENCIO; BADINO, 2018; DE OLIVEIRA et al., 2020).

Com base nos trabalhos do Grupo de Bioenergia do IBILCE/UNESP, Mendes et al. (2017) avaliaram a viabilidade econômica de uma planta piloto produtora de enzimas (PPE) por CES adjacente às plantas de produção de E1G e E2G. A Tabela 1 apresenta os principais parâmetros operacionais adotados pelos autores. Nessa planta, as condições ideais de cultivo determinadas por Zanelato et al. (2012) para o cultivo do fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b em bagaço de cana de açúcar e farelo de trigo em biorreatores de leito empacotado foram adotadas. Posteriormente, Perez (2017) realizou estudos de ampliação de escala que contribuíram para a proposição de Mendes e colaboradores.

Nessa abordagem, assume-se que as enzimas serão consumidas localmente pela planta de E2G e que o fluxo de utilidades necessárias, tais como vapor, água, energia elétrica, ar comprimido e funcionários seriam compartilhados pelos processos. Foi assumida uma indústria sucroenergética brasileira média, capaz de processar 1,6 milhões de toneladas de cana-de-açúcar por safra. A Tabela 2 traz algumas das premissas assumidas pelos autores. Levando-se em conta os valores apresentados quanto a taxa de bagaço gerado (0,28 t bagaço/t cana), consumo médio de vapor adotado para unidade industrial (0,42 t vapor/t cana), e eficiências das caldeiras (2,10 t vapor/t bagaço), os autores calculam que o montante de bagaço com umidade 50 % (b.u.) destinado ao funcionamento da planta para produção de açúcar e etanol convencional, corresponde 71% do total de bagaço gerado por safra. Do total de bagaço de cana produzido destinam-se 5% para reserva energética, o *start up* da usina no início de safra. A proposição ainda leva em conta um processo E1G ininterrupto, situação rara em um cenário real devido a paradas técnicas, exigindo um

excedente de quase 5% do bagaço. Dessa forma, cerca de 19% do total de bagaço fica disponível para aos processos de E2G e para PPE.

Tabela 1 - Condições operacionais do CES em biorreatores de leite empacotado em escala de bancada.

| <i>Parâmetros</i>                                        | <i>Valor</i> | <i>Unidade</i>                      |
|----------------------------------------------------------|--------------|-------------------------------------|
| Proporção de bagaço de cana-de-açúcar ao farelo de trigo | 7:3          | em massa                            |
| Teor de umidade                                          | 75           | (%, b.u.)                           |
| Temperatura                                              | 45           | °C                                  |
| Tempo de cultivo                                         | 96           | h                                   |
| Densidade do leite empacotado                            | 330          | kg.m <sup>3</sup>                   |
| Taxa de aeração                                          | 267          | L.h <sup>-1</sup> .kg <sup>-1</sup> |
| Diâmetro do biorreator                                   | 7,62 e 20    | cm                                  |
| Comprimento do biorreator                                | de 40 a 200  | cm                                  |
| Atividade de endoglucanase                               | acima de 800 | U/g.s.s <sup>a</sup>                |
| Atividade da FPU <sup>b</sup>                            | acima de 12  | U/g.s.s                             |

Notas:

<sup>a</sup> g.s.s – gramas de substrato seco.

<sup>b</sup> FPU – unidades de papel filtro.

Fonte: extraído e adaptado de (MENDES; ATALA; THOMÉO, 2017).

A partir do bagaço de cana disponível, três cenários de produção para PPE foram avaliados, neles percentuais de 5%, 10% e 15% do total de bagaço úmido disponível foram encaminhados como substrato para o CES. Esses valores, juntamente com o montante de farelo de trigo requerido, correspondem a um total de 4.000, 8.000 e 12.000 toneladas de biomassa úmida a serem processadas por safra para a produção de enzimas. Esses cenários são identificados pelos autores como SIM1, SIM 2 e SIM 3, respectivamente. Analisou-se também os efeitos da atividade enzimática sobre a viabilidade econômica do investimento, os valores de 6, 12, 18 e 25 FPU/g.s.s. (*Filter Paper Unit* por gramas de substrato seco) que foram

estabelecidos e aplicados aos cenários de disponibilidade de bagaço previamente descritos.

Tabela 2 - Parâmetros de operação para uma usina sucroenergética brasileira de médio porte.

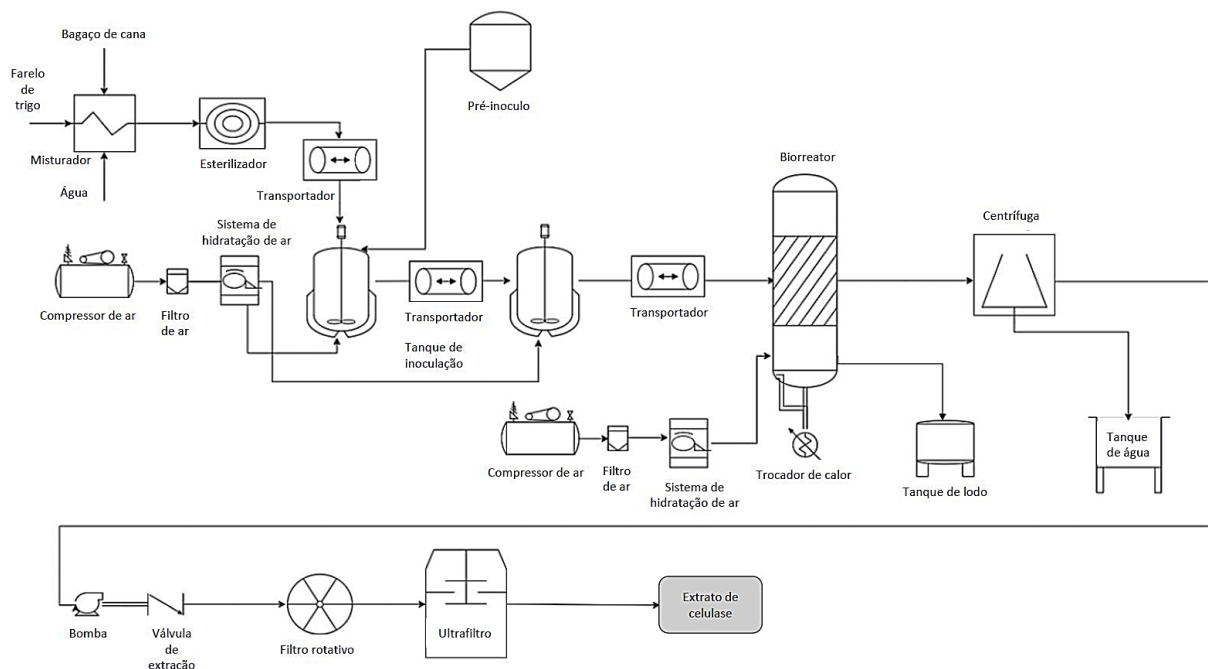
| <i>Dados operacionais</i>                          | <i>Valor</i> | <i>Unidade</i>    |
|----------------------------------------------------|--------------|-------------------|
| Cana processada                                    | 1.600.000,00 | t /safra          |
| Bagaço gerado                                      | 0,28         | t bagaço/ t cana  |
| Umidade do bagaço gerado                           | 50           | %, b.u.           |
| Reserva de bagaço para <i>start up</i>             | 5            | %                 |
| Consumo médio de vapor                             | 0,42         | t vapor / t cana  |
| Eficiência das caldeiras                           | 2,10         | t vapor/ t bagaço |
| Excedente de bagaço para processo E1G ininterrupto | 5            | %                 |
| Dias de safra                                      | 240          | dia               |
| Aproveitamento do tempo                            | 85           | %                 |

Fonte: (MENDES, 2015; MENDES; ATALA; THOMÉO, 2017).

Dos diferentes cenários de disponibilidade de bagaço de cana e farelo de trigo analisados, apenas o terceiro cenário (SIM3) foi considerado economicamente viável, devido a um de *payback* de 10 anos e TIR (Taxa Interna de Retorno) de 11,27 %, tendo como condição uma atividade enzimática mínima de 12 FPU/g.s.s.. Foi somente a partir de uma atividade enzimática de 18 FPU/g.s.s. que todos os cenários apresentaram viabilidade econômica satisfatória, de acordo com os indicadores econômicos do setor sucro-alcooleiro, indicando assim a necessidade de melhora das condições de produção da enzima e apontando a atividade enzimática como a principal variável que influencia a viabilidade econômica da produção de celulases (LIMA, 2011; MENDES, 2015). Conjuntamente, a estimativa dos indicadores econômicos mais importantes mostrou que o processo de CES é economicamente

atrativo, devido à sua fácil integração ao processo principal, e sua receita que é até quatro vezes maior do que a cogeração de eletricidade (MENDES; ATALA; THOMÉO, 2017). A Figura 8 traz o fluxograma idealizado por Mendes et al. (2017) em seu estudo para a PPE por CES. O fluxograma compreende as etapas de mistura da matéria prima, sua esterilização, inoculação, cultivo, extração das enzimas e concentração do extrato enzimático para atingir a atividade enzimática mínima de 18 FPU/g.s.s..

Figura 8 - Fluxograma do processo de produção de enzimas fibrolíticas por cultivo em estado sólido.



Fonte: (MENDES; ATALA; THOMÉO, 2017).

O processo idealizado pelos autores conta com o cultivo prévio do fungo termófilo em tanques de inoculação, onde posteriormente, a partir de uma solução nutritiva balanceada, produz-se a suspensão de esporos para inoculação (MENDES, 2015). A suspensão de esporos e os substratos previamente esterilizados são adicionados ao biorreator com capacidade nominal de 25 m<sup>3</sup>, preenchido com 75% de sua capacidade, adotada como medida de segurança. O volume do biorreator foi adotado seguindo-se recomendação de (LIMA, 2011), que fizeram estudo similar ao de Mendes e colaboradores, avaliando capacidades de biorreatores de 10, 25 e 50 m<sup>3</sup>. Após o cultivo o extrato enzimático é manipulado usando filtros de vácuo rotativos, para separação do extrato líquido do material sólido cultivado; ademais, centrífugas e

ultrafiltros, clarificam e concentram o extrato para o armazenamento em tanques, o qual não requer nenhum tratamento especial, uma vez que sua aplicação será imediata na planta de E2G (MENDES, 2015), além disso, sabe-se que o extrato pode ser mantido em temperatura ambiente por até 30 dias sem diminuição significativa da atividade das enzimas (ZANELATO et al., 2012; SHIOTA, 2014). Da biomassa cultivada restante, considerou-se que 90% da celulose sendo recuperada e encaminhada para o processo de E2G (HEINZLE; BIWER; COONEY, 2007; MENDES; ATALA; THOMÉO, 2017). Na Tabela 3 estão listados os principais equipamentos requeridos pela PPE no SIM3 (12.000 toneladas), único cenário economicamente viável para a atividade enzimática obtida efetivamente pelos estudos do Grupo de Pesquisa em Bioenergia do IBILCE/UNESP.

Conforme dito anteriormente, a configuração apresentada por Mendes et al. (2017) fez parte de um estudo de caso para avaliação econômica de implantação de uma PPE para produção local de enzimas celulolítica. Detalhes das operações estabelecidas no fluxograma não estavam no escopo do trabalho, o que dificulta em parte o planejamento efetivo de um processo de produção dessas enzimas. No geral, pode-se apontar alguns aspectos passíveis de aprimoramento ao longo do fluxograma retratado. O primeiro aspecto diz respeito à produção do inóculo em tanques agitados, para o qual os autores não dão maiores detalhes, não sendo informado se o cultivo seria em estado sólido ou submerso. Observa-se também o tempo de 2 dias estabelecido para carregamento, descarregamento e esterilização dos biorreatores de leito empacotado, o que parece ser excessivo para um cenário industrial de produção contínua. O terceiro aspecto diz respeito ao tamanho do biorreator selecionado. Essa escolha, conforme apontado pelos próprios autores, limita a operação e resulta em uma grande quantidade de equipamentos, e por consequência maiores custos de manutenção e mão de obra. Ademais, os resultados das simulações executadas pelos autores em Casciatori et al. (2016) demonstram que, para biorreatores de leito empacotado com diâmetros a partir de 50 cm, a remoção de calor por meio da circulação de água pela camisa do biorreator não é eficiente no controle da temperatura interna ao longo do cultivo. Dessa forma, pode-se assumir que os mesmos problemas de operação e as soluções de engenharia adotadas para um biorreator de 25 m<sup>3</sup> seriam aplicáveis para biorreatores de maior capacidade, fazendo com que volumes maiores possam ser cogitados em estudos posteriores de implantação industrial. Por fim, nota-se que o processo de extração selecionado faz

uso de uma grande quantidade de água, que posteriormente deve ser retirada em uma operação de concentração, ocasionando custos adicionais ao produto final.

Partindo do cenário industrial e da PPE propostos em Mendes et al. (2017), na próxima seção será apresentado um novo balanço material global e uma nova proposta de produção na qual buscou-se apresentar soluções aos impasses apontados acima, tendo como base o balanço material proposto.

Tabela 3 - Dimensão e quantidade de equipamento para o processo de produção de enzimas por CES, com base na disponibilidade do substrato.

| <i>Equipamento</i>            | <i>Capacidade/potência</i> | <i>Quantidade</i> |
|-------------------------------|----------------------------|-------------------|
| Esterilizador                 | 25 m <sup>3</sup>          | 36                |
| Compressor                    | 75 kW                      | 28                |
| Misturador                    | 50 m <sup>3</sup>          | 8                 |
| Tanque de inoculação          | 50 m <sup>3</sup>          | 8                 |
| Biorreator CES                | 25 m <sup>3</sup>          | 28                |
| Sistema de umidificação de ar | 1 kg/s                     | 3                 |
| Centrífuga/filtro             | 3 m x 6 m                  | 3                 |
| Ultrafiltro                   | 58 m <sup>3</sup>          | 3                 |
| Tanque produto final          | 90 m <sup>3</sup>          | 1                 |
| Tanque resíduos sólidos       | 100 m <sup>3</sup>         | 6                 |
| Correia transportadora        | 25 m                       | -                 |
| Rosca helicoidal              | 25 m                       | -                 |

Fonte: (MENDES; ATALA; THOMÉO, 2017).

## 5 PROCESSO DE PRODUÇÃO INDUSTRIAL IN-HOUSE DE ENZIMAS CELULOLÍTICAS: PROPOSIÇÃO ATUAL

### 5.1 Balanço material global

Para a proposta atual, o processo de produção das enzimas celulolíticas foi dividido conforme as etapas apresentadas na Figura 9. No diagrama estão retratadas as principais etapas, materiais e produtos participantes da cadeia de produção na PPE. Na etapa de preparo do substrato, farelo de trigo e bagaço de cana são propriamente esterilizados e condicionados para dosagem na composição da biomassa, que é feita na etapa seguinte de mistura e inoculação. O preparo do inóculo ocorre separadamente, em paralelo com o processo principal, utilizando o farelo de trigo como substrato para produção do inóculo por cultivo em estado sólido em biorreatores de bandeja. A etapa de CES para a produção de enzimas celulolíticas se processa nos biorreatores de leito empacotados e a biomassa cultivada é encaminhada em seguida para extração onde ocorre a separação entre o extrato e a biomassa residual, ambos encaminhados para consumo *in loco* na planta de E2G.

O balanço de material desta proposição é baseado no cenário SIM3 do estudo de Mendes et al. (2017), que previa o processamento de 12.000 toneladas da mistura bagaço/farelo. Sendo assim, adotou-se também as mesmas condições operacionais para o CES deste trabalho, apresentadas na Tabela 1, e os parâmetros de operação da usina sucroenergética de médio porte descritos na Tabela 2, bem como algumas das premissas do projeto daqueles autores. Outros dados antecedentes, como a umidade dos substratos e produtos intermediário e finais são mostrados na Tabela 4. Além disso, com base no percentual de umidade da biomassa durante o cultivo, calculou-se a densidade do leito empacotado, conforme a Equação 5.1 (CASCIATORI et al., 2014) como sendo de 276,79 kg/m<sup>3</sup>.

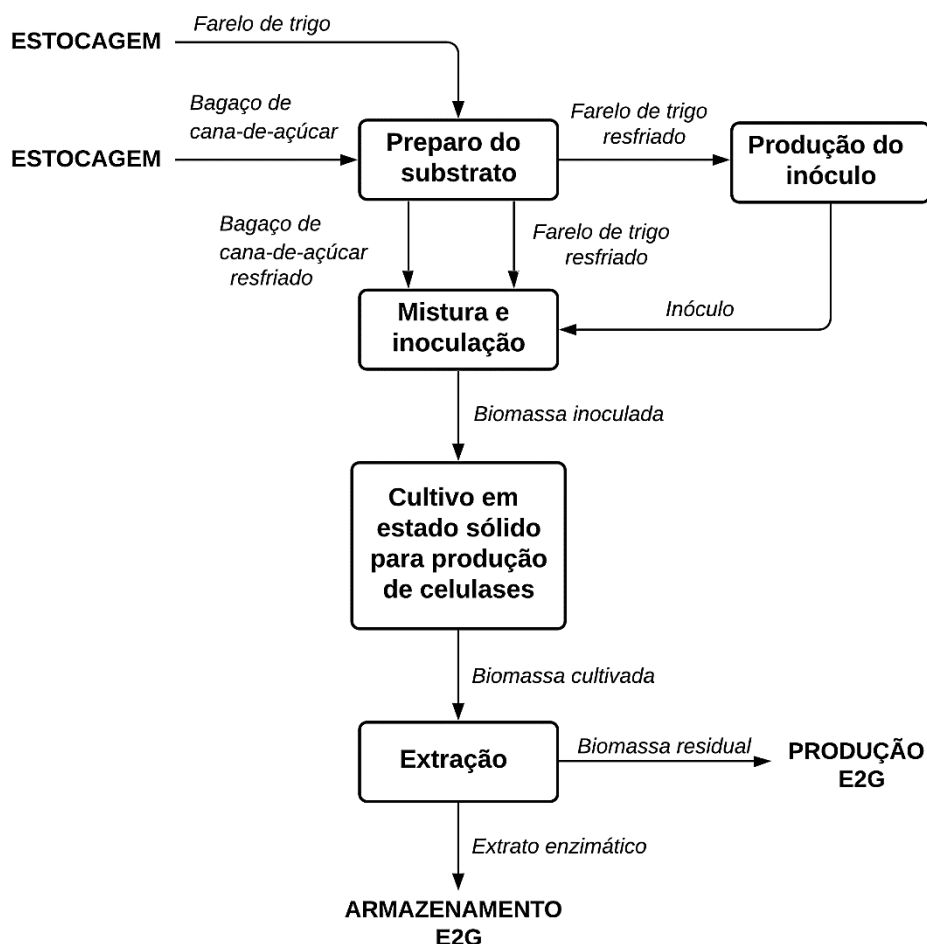
$$\rho_{bulk\ 7:3} = 0,085 + 0,005 e^{\left(\frac{uBM_{cultivo}/100}{0,20565}\right)} \quad (5.1)$$

Sendo:

$\rho_{bulk\ 7:3}$  - densidade *bulk* para a proporção bagaço: farelo 7:3, em kg/m<sup>3</sup>

$uBM_{cultivo}$  - umidade da biomassa durante o cultivo, em %, b.u.

Figura 9 - Diagrama simplificado das etapas de produção da PPE atual.



Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 4 - Parâmetros de umidade adotados no balanço material.

| Parâmetro                                                                          | Valor | Unidade | Referência                    |
|------------------------------------------------------------------------------------|-------|---------|-------------------------------|
| Umidade do bagaço de cana                                                          | 50    | %, b.u. | (MENDES, 2015)                |
| Umidade do farelo de trigo                                                         | 20    | %, b.u. | (MENDES, 2015)                |
| Umidade da biomassa no início do cultivo (biorreator de leite empacotado)          | 75    | %, b.u. | (MENDES; ATALA; THOMÉO, 2017) |
| Umidade do farelo de trigo usado na preparação do inóculo (biorreator de bandejas) | 70    | %, b.u. | Este trabalho                 |
| Umidade da biomassa residual                                                       | 70    | %, b.u. | (SANTOS, 2009)                |

Fonte: elaborada pela autora.

Partindo-se das premissas estabelecidas acima, o balanço material tem início com o cálculo do tempo efetivo de safra. Para um tempo de safra de 240 dias e um aproveitamento de tempo de 85% (MENDES, 2015), obtém-se um tempo de safra efetivo de 204 dias (Equação 5.2) ou 4.896 horas (Equação 5.3).

$$t_{efetivoD} = t_{safra} \cdot \left( \frac{rend_{safra}}{100} \right) \quad (5.2)$$

$$t_{efetivoH} = t_{safra} \cdot \left( \frac{rend_{safra}}{100} \right) \cdot 24 \quad (5.3)$$

Sendo:

$t_{efetivoD}$  - tempo efetivo de safra, em dias

$t_{safra}$  - tempo de safra, em dias

$rend_{safra}$  - aproveitamento do tempo, em %

$t_{efetivoH}$  - tempo efetivo de safra, em horas

Para um total de 1.600.000 t/safra (toneladas por safra) de cana processada, e uma proporção de bagaço gerado de 0,28 t bagaço/t cana, a Equação 5.4 estima um montante de 448.000 t/safra de bagaço de cana. Os valores de produção diária e por hora são obtidos pela divisão da produção por safra pelo tempo efetivo em dias e em horas, respectivamente.

$$BG_{gerado} = cana_{process} \cdot tx_{BG_{gerado}} \quad (5.4)$$

Sendo:

$BG_{gerado}$  - bagaço de cana gerado pela usina, em t/safra

$can_{process}$  - total de cana processada, em t/safra

$tx_{BG_{gerado}}$  - proporção de bagaço gerado, em t bagaço/t cana

A partir da quantidade de bagaço produzido são calculados os valores de bagaço destinados para reserva de *start up* (5%), consumo nas caldeiras (0,20 t/t cana), e o excedente de bagaço para processo E1G ininterrupto (5%), na devida

ordem pelas Equações 5.5, 5.6 e 5.7, tendo como resultado os valores 22.400 t/safra, 320.000 t/safra, 22.400 t/safra.

$$BG_{start} = BG_{gerado} \cdot \frac{tx_{BG_{start}}}{100} \quad (5.5)$$

$$BG_{consumido} = cana_{process} \cdot tx_{BG_{caldeiras}} \quad (5.6)$$

$$BG_{initerrupto} = BG_{gerado} \cdot tx_{BG_{initerrupto}} \quad (5.7)$$

Sendo:

- $BG_{start}$  - bagaço de cana reservado para *start up* da usina, em t/safra
- $tx_{BG_{start}}$  - reserva de bagaço, em %
- $BG_{consumido}$  - bagaço de cana consumido pelo processo, em t/safra
- $tx_{BG_{caldeiras}}$  - consumo de bagaço pelas caldeiras, em t/t cana
- $BG_{initerrupto}$  - bagaço de cana extra consumido por E1G ininterrupta, t/safra
- $tx_{BG_{initerrupto}}$  - consumo da atuação E1G ininterrupta, em %

Dessa forma, o bagaço de cana disponível para ser usado na produção de E2G e na PPE é um total de 83.200 t/safra, dado pela Equação 5.8. A seguir, estimou-se a quantidade de bagaço em massa seca para a PPE, conforme apresentado na Equação 5.9, pois os cálculos para a PPE são feitos em base seca. Estes cálculos resultaram em 41.600 t.s.s./safra (toneladas de substrato seco por safra).

$$BG_{disponível} = BG_{gerado} - BG_{consumido} - BG_{start} - BG_{initerrupto} \quad (5.8)$$

$$BG_{disponível\ seco} = BG_{disponível} \cdot \frac{uBG_{in\ natura}}{100} \quad (5.9)$$

Sendo:

- $BG_{disponível}$  - bagaço de cana disponível para E2G e PPE, em t/safra
- $BG_{disponível\ seco}$  - bagaço de cana disponível para E2G e PPE, em t.s.s./safra
- $uBG_{in\ natura}$  - umidade do bagaço de cana *in natura*, em %

Para produção na PPE fixou-se o cenário SIM 3 de Mendes et al. (2017), ou seja, 12.000 t/safra de uma mistura de bagaço de cana úmido (50%) e farelo de trigo úmido (20%), assim, 11,38% do bagaço de cana disponível é enviado para produção de enzimas, 9.468,16 t/safra, conforme a Equação 5.10, o que é igual a 4.734,08 t.s.s./safra (base seca). A proporção 7:3 é então aplicada e tem-se que a quantidade de farelo de trigo para PPE é de 2.028,89 t.s.s./safra ou 2.536,11 t/safra, em base úmida (Equações 5.11 e 5.12).

$$BG_{PPE} = BG_{disponível} \cdot \frac{tx_{BG_{PPE}}}{100} \quad (5.10)$$

$$FT_{PPE\ seco} = BG_{PPE\ seco} \cdot \frac{tx_{BG_{7:3}}}{tx_{FT_{7:3}}} \quad (5.11)$$

$$FT_{PPE} = FT_{PPE\ seco} \cdot \frac{uFT_{in\ natural}}{100} \quad (5.12)$$

Sendo:

- $BG_{PPE}$  - bagaço de cana disponível enviado para PPE, em t/safra
- $tx_{BG_{PPE}}$  - desvio de bagaço de cana disponível para PPE, em %
- $FT_{PPE\ seco}$  - farelo de trigo seco enviado para PPE, em t.s.s./safra
- $BG_{PPE\ seco}$  - bagaço de cana disponível enviado para PPE, em t.s.s./safra
- $tx_{BG_{7:3}}$  - proporção de bagaço de cana na composição da biomassa, em %, peso
- $tx_{FT_{7:3}}$  - proporção de farelo de trigo na composição da biomassa, em %, peso
- $FT_{PPE}$  - farelo de trigo enviado para PPE, em t.s.s./safra
- $uFT_{in\ natural}$  - umidade do farelo de trigo *in natural*, em %

Pelo cenário de produção estabelecido de processamento de biomassa para PPE (12.000 t/safra), juntamente com a atividade enzimática média adotada de 12,5 FPU/g.s.s., calcula-se, pelas Equações 5.13 e 5.14, a atividade enzimática da planta por safra e por metros cúbicos de extrato total produzido, resultantes em  $8,45 \times 10^{10}$  FPU/safra e  $4,59 \times 10^5$  FPU/m<sup>3</sup>.

$$At_{enzPPE_S} = BM_{PPE\ seco} \cdot At_{enzMédia_S} \cdot 10^6 \quad (5.13)$$

$$At_{enzPPE_L} = At_{enzPPE_S} \cdot EZ_{PPE} \quad (5.14)$$

Sendo:

$At_{enzPPE_S}$  - atividade enzimática da planta por safra, em FPU/safra

$BM_{PPE\ seco}$  - biomassa para PPE, em t.s.s./safra

$At_{enzMédias}$  - atividade enzimática média da PPE, em FPU/g.s.s.

$At_{enzPPE_L}$  - atividade enzimática da planta, em FPU/m<sup>3</sup>

$EZ_{PPE}$  - extrato enzimático produzido pela PPE, em m<sup>3</sup>/safra

A Tabela 5 resume os valores estimados de biomassa mencionados anteriormente. A seguir, é apresentado o fluxograma de processo dessa proposição, estruturado com base nos resultados do balanço material aqui apresentado.

Tabela 5 - Balanço material global da nova proposição para PPE.

**Tempo de operação**

(continua)

| Descrição              | Valor    | Unidade |
|------------------------|----------|---------|
| Tempo de safra         | 240,00   | dia     |
| Aproveitamento         | 85,00    | %       |
| Tempo de safra efetivo | 204,00   | dia     |
| Tempo de safra efetivo | 4.896,00 | horas   |

**Cana de açúcar e bagaço**

| Descrição                  | Valor        | Unidade          |
|----------------------------|--------------|------------------|
| Cana processada            | 1.600.000,00 | t /safra         |
| Proporção BG gerado        | 0,28         | t bagaço/ t cana |
| BG gerado in natura        | 448.000,00   | t /safra         |
| BG gerado in natura dia    | 2.196,08     | t /dia           |
| BG gerado in natura hora   | 91,50        | t /h             |
| BG gerado seco             | 224.000,00   | t.s.s./safra     |
| BG gerado seco dia         | 1.098,04     | t.s.s./dia       |
| BG gerado seco hora        | 45,75        | t.s.s./h         |
| Reserva de BG              | 5,00         | %                |
| BG start-up in natura      | 22.400,00    | t /safra         |
| BG start-up in natura dia  | 109,80       | t /dia           |
| BG start-up in natura hora | 4,58         | t /h             |

Tabela 5 - Balanço material global da nova proposição para PPE.

(continuação)

| <b>Descrição</b>             | <b>Valor</b> | <b>Unidade</b> |
|------------------------------|--------------|----------------|
| <i>BG start-up seco</i>      | 11.200,00    | t.s.s./safra   |
| <i>BG start-up seco dia</i>  | 54,90        | t.s.s./dia     |
| <i>BG start-up seco hora</i> | 2,29         | t.s.s./h       |

**Usina Sucroenergética**

| <b>Descrição</b>                      | <b>Valor</b> | <b>Unidade</b>    |
|---------------------------------------|--------------|-------------------|
| <i>Consumo médio de vapor</i>         | 0,42         | t vapor / t cana  |
| <i>Eficiência caldeiras</i>           | 2,10         | t vapor/ t bagaço |
| <i>Consumo de BG</i>                  | 0,20         | t / t cana        |
| <i>BG consumido in natura</i>         | 320.000,00   | t / safra         |
| <i>BG consumido in natura dia</i>     | 1.568,63     | t /dia            |
| <i>BG consumido in natura hora</i>    | 65,36        | t /h              |
| <i>BG consumido seco</i>              | 160.000,00   | t.s.s./ safra     |
| <i>BG consumido seco dia</i>          | 784,31       | t.s.s./dia        |
| <i>BG consumido seco hora</i>         | 32,68        | t.s.s./h          |
| <i>Consumo de BG E1G ininterrupto</i> | 5,00         | %                 |
| <i>BG ininterrupto in natura</i>      | 22.400,00    | t /safra          |
| <i>BG ininterrupto in natura dia</i>  | 109,80       | t /dia            |
| <i>BG ininterrupto in natura hora</i> | 4,58         | t /h              |
| <i>BG ininterrupto seco</i>           | 11.200,00    | t.s.s./safra      |
| <i>BG ininterrupto seco dia</i>       | 54,90        | t.s.s./dia        |
| <i>BG ininterrupto seco hora</i>      | 2,29         | t.s.s./h          |

**Bagaço disponível**

| <b>Descrição</b>                    | <b>Valor</b> | <b>Unidade</b> |
|-------------------------------------|--------------|----------------|
| <i>BG disponível in natura</i>      | 83.200,00    | t /safra       |
| <i>BG disponível in natura dia</i>  | 407,84       | t /dia         |
| <i>BG disponível in natura hora</i> | 16,99        | t /h           |
| <i>BG disponível seco</i>           | 41.600,00    | t.s.s./safra   |
| <i>BG disponível seco dia</i>       | 203,92       | t.s.s./dia     |
| <i>BG disponível seco hora</i>      | 8,50         | t.s.s./h       |

Tabela 5 - Balanço material global da nova proposição para PPE.

(conclusão)

**Planta produtora de enzimas celulolíticas**

| <b>Descrição</b>                         | <b>Valor</b> | <b>Unidade</b> |
|------------------------------------------|--------------|----------------|
| <i>Consumo planta celulase</i>           | 11,38        | %              |
| <i>BG planta celulase in natura</i>      | 9.468,16     | t /safra       |
| <i>BG planta celulase in natura dia</i>  | 46,41        | t /dia         |
| <i>BG planta celulase in natura hora</i> | 1,93         | t /h           |
| <i>BG planta celulase seco</i>           | 4.734,08     | t.s.s./safra   |
| <i>BG planta celulase seco dia</i>       | 23,21        | t.s.s./dia     |
| <i>BG planta celulase seco hora</i>      | 0,97         | t.s.s./h       |
| <i>FT planta celulase seco</i>           | 2.028,89     | t.s.s./safra   |
| <i>FT planta celulase seco dia</i>       | 9,95         | t.s.s./dia     |
| <i>FT planta celulase seco hora</i>      | 0,41         | t.s.s./h       |
| <i>FT planta celulase in natura</i>      | 2.536,11     | t /safra       |
| <i>FT planta celulase in natura dia</i>  | 12,43        | t /dia         |
| <i>FT planta celulase in natura hora</i> | 0,52         | t /h           |
| <i>BM planta celulase in natura</i>      | 12.004,27    | t /safra       |
| <i>BM planta celulase in natura dia</i>  | 58,84        | t /dia         |
| <i>BM planta celulase in natura hora</i> | 2,45         | t /h           |
| <i>BM planta celulase seco</i>           | 6.762,97     | t.s.s./safra   |
| <i>BM planta celulase seco dia</i>       | 33,15        | t.s.s./dia     |
| <i>BM planta celulase seco hora</i>      | 1,38         | t.s.s./h       |

**Planta produtora de enzimas celulolíticas - atividade enzimática**

| <b>Descrição</b>                                | <b>Valor</b> | <b>Unidade</b>     |
|-------------------------------------------------|--------------|--------------------|
| <i>Atividade enzimática total</i>               | 8,45E+10     | FPU/safra          |
| <i>Atividade enzimática total dia</i>           | 4,14E+08     | FPU/dia            |
| <i>Atividade enzimática total hora</i>          | 1,73E+07     | FPU/h              |
| <i>Atividade enzimática da planta por safra</i> | 4,59E+05     | FPU/m <sup>3</sup> |

Fonte: elaborado pela autora.

**5.2 Fluxograma de processo e descrição das etapas**

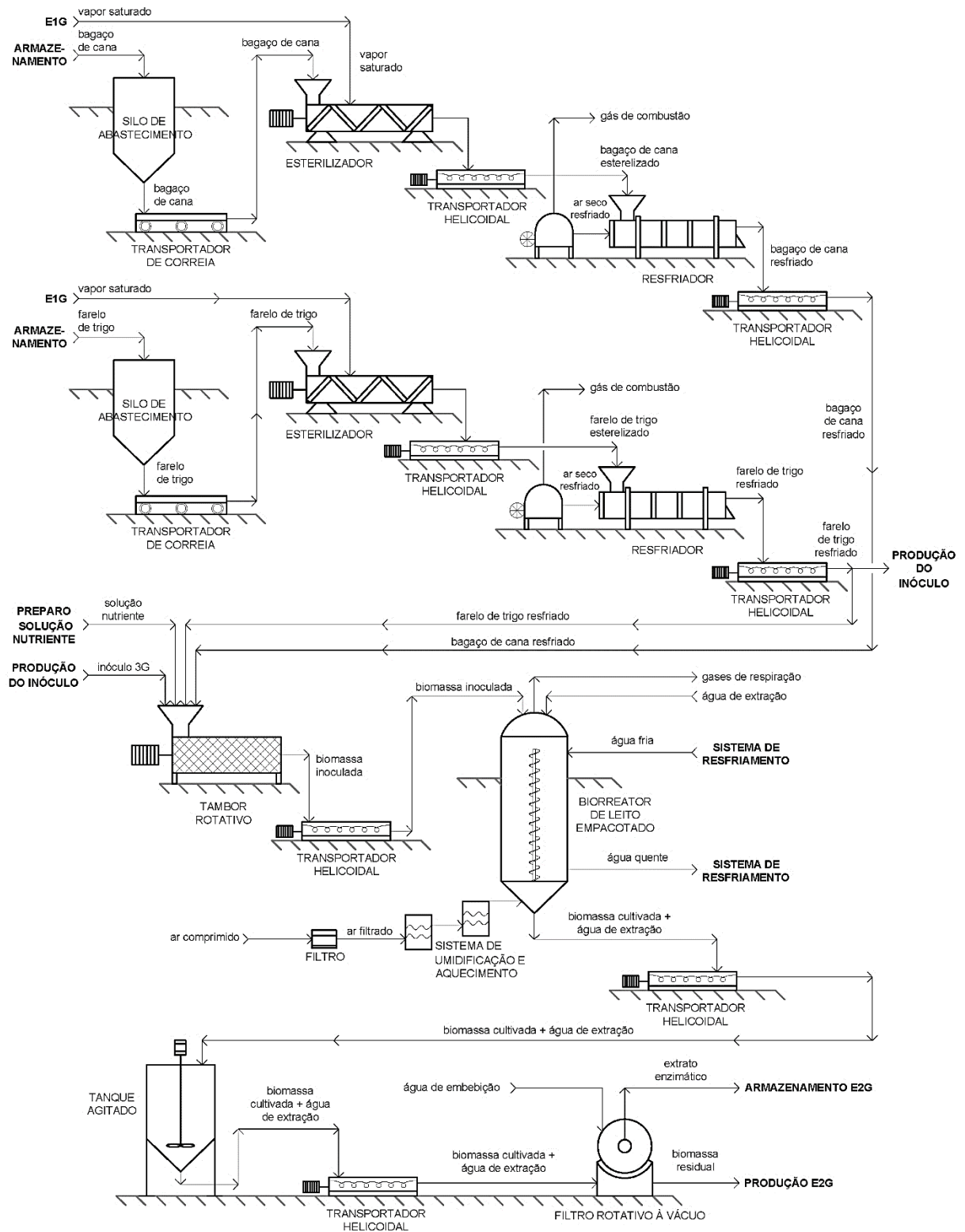
Uma vez calculadas as vazões materiais globais da PPE, iniciou-se a tarefa de estruturar um processo industrial que se encaixasse no contexto de produção de uma usina sucroenergética, possibilitando o compartilhamento de algumas facilidades e mão de obra. As soluções apontadas para os desafios de operação da planta industrial resultaram em uma estrutura de produção aprimorada em relação à de Mendes et al. (2017), apresentada nas Figuras 10 e 11.

Comparando-se com o fluxograma apresentado por Mendes et al. (2017), na Figura 8, a primeira mudança observada diz respeito à forma como os substratos são preparados antes da inoculação. Nesta proposição, os substratos são tratados separadamente e a esterilização é realizada de forma contínua. Além disso, incluiu-se a operação de resfriamento desses substratos para antes da etapa de mistura e inoculação, que agora ocorre em um só equipamento. Quanto ao preparo do inóculo, projetou-se um processo de produção desse inóculo por CES em paralelo ao processo principal de obtenção das enzimas celulolíticas. Detalhes de construção do biorreator de leite empacotado, carregamento e descarregamento do mesmo são apresentados na etapa de cultivo em estado sólido e, finalmente, para obtenção do extrato enzimático estabeleceu-se um processo simples de agitação seguido de filtração para separação dos componentes sólidos.

De um modo geral, o processo esquematizado nos fluxogramas das Figura 10 e 11 é semi-contínuo. As etapas de preparo do substrato, mistura e inoculação, e extração do extrato enzimático são contínuas, enquanto que as de preparo do inóculo e de cultivo em estado sólido para a produção das celulasas são em batelada. Para que a produção de enzimas, como um todo, seja contínua, a quantidade de equipamentos e os tempos de produção foram estabelecidos a fim de se adequar ambos os fluxos de processo.

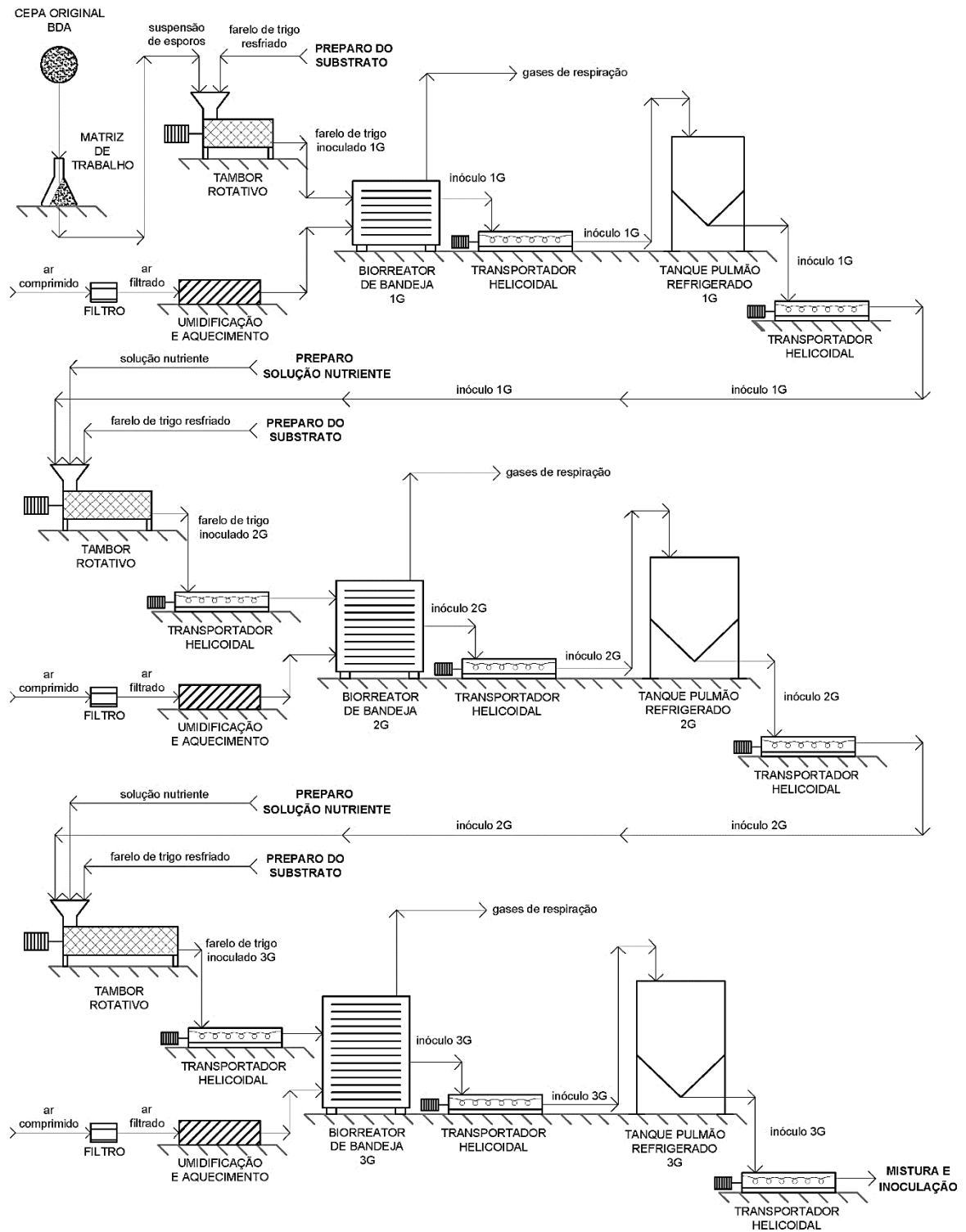
A seguir são descritas as operações e os equipamentos identificados nos fluxogramas de processos apresentados.

Figura 10 - Fluxograma de processo da proposição atual da PPE por CES.



Fonte: elaborado pela autora.

Figura 11 - Fluxograma de processo da etapa de produção do inóculo da PPE

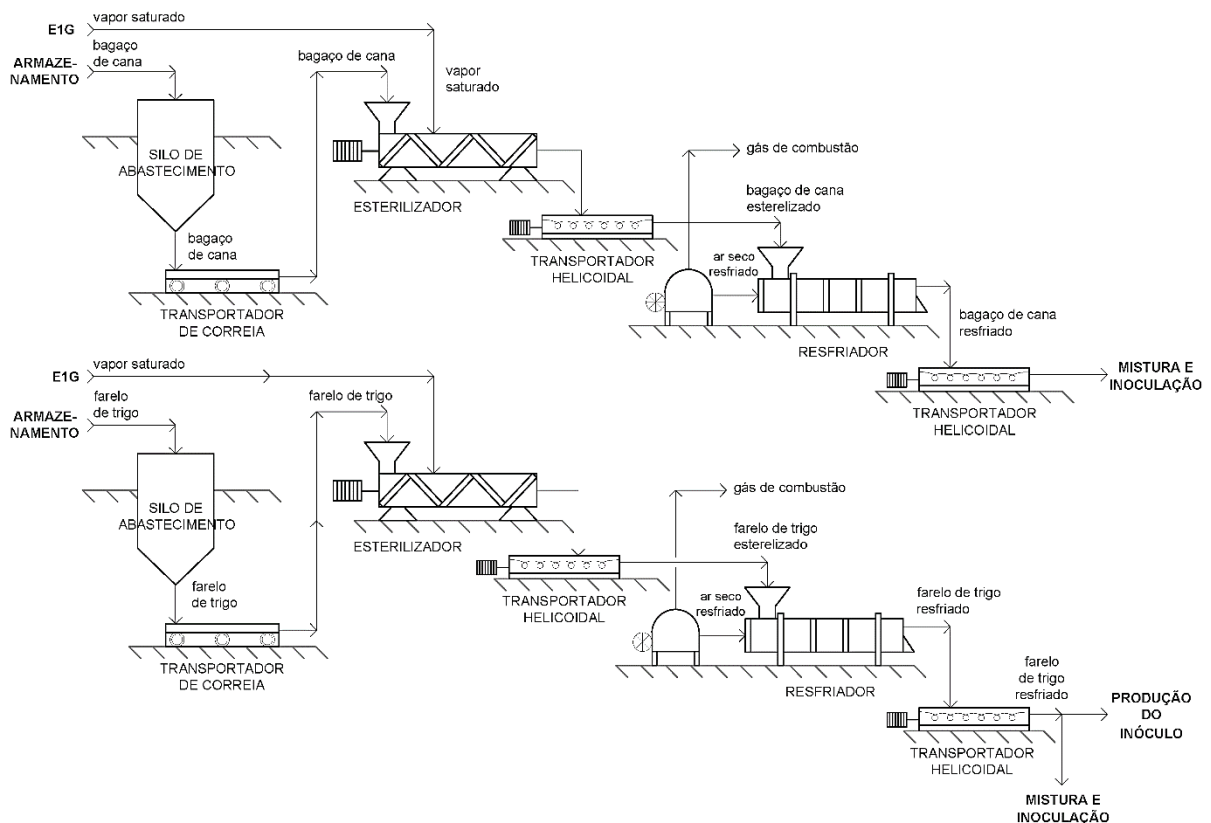


Fonte: elaborado pela autora.

### 5.2.1 Preparo do substrato

A etapa de preparo do substrato contempla as operações de esterilização e resfriamento das correntes de bagaço de cana e farelo de trigo que entram no sistema, a Figura 12 traz um recorte desta etapa. Para cada um dos substratos uma linha de operação é montada, sendo a ordem das operações a mesma para ambos os materiais, diferenciando-se apenas quanto ao encaminhamento das correntes de saída.

Figura 12 - Fluxograma de processo da etapa de preparo do substrato da PPE.



Fonte: elaborado pela autora.

O bagaço de cana proveniente do E1G e o farelo de trigo adquirido são encaminhados para os silos de abastecimento, com capacidade de armazenamento para 6 horas de processo. O transporte dessas matérias primas até o esterilizador é feito por transportadores de correia. Dos silos, os substratos são encaminhados para o esterilizador, que opera de forma contínua. Para proceder à esterilização, vapor saturado é injetado dentro do canhão pressurizado e o tempo de residência é dado

pela velocidade da rosca sem fim, sendo este tempo determinado pela temperatura do vapor saturado. Como consequência desse processo, estima-se que parte do vapor condensado é absorvido pelo material durante a esterilização. Os materiais úmidos são então conduzidos ao resfriador em tambor rotativo, projetados para resfriar os materiais pela passagem de ar seco, possibilitando a troca de calor por convecção e por evaporação da água. O ar necessário a esta operação deverá ser filtrado para reduzir a carga microbiana e evitar a contaminação exógena dos substratos. Na saída do resfriador, os materiais estarão na umidade original (50 % para o bagaço de cana e 20 % para o farelo de trigo) e a 45 °C, temperatura de cultivo de *M. thermophila* I-1D3b para a produção das enzimas. Todo o bagaço de cana é então destinado para etapa seguinte de mistura e inoculação, enquanto que parte do farelo de trigo é direcionada para o preparo do inóculo e o restante segue o mesmo destino do bagaço de cana. A partir do esterilizador, a planta de produção deve ser isolada do restante do processo e o ar ambiente deve ser continuamente renovado e filtrado para remoção de microrganismos contaminantes. O transporte dos materiais do esterilizador até os biorreatores de leito empacotado é feito por rosca sem fim no interior de tubulações para minimizar riscos de contaminação.

Na Tabela 6 encontram-se relacionados os equipamentos presentes nessa etapa de processamento, suas capacidades nominais e a quantidade de equipamentos necessários para atender ao processo.

Tabela 6 - Equipamentos da etapa de preparo do substrato.

| <b><i>Linha de bagaço de cana</i></b>  |                           |                   |
|----------------------------------------|---------------------------|-------------------|
| <i>Equipamento</i>                     | <i>Capacidade nominal</i> | <i>Quantidade</i> |
| Silo de alimentação                    | 60 m <sup>3</sup>         | 2                 |
| Transportador de correia               | 20 m <sup>3</sup> /h      | -                 |
| Esterilizador                          | 2 t/h                     | 1                 |
| Resfriador                             | 7 t/h                     | 1                 |
| Transportador helicoidal               | 20 m <sup>3</sup> /h      | -                 |
| <b><i>Linha de farelo de trigo</i></b> |                           |                   |
| <i>Equipamento</i>                     | <i>Capacidade nominal</i> | <i>Quantidade</i> |
| Silo de alimentação                    | 30 m <sup>3</sup>         | 1                 |
| Transportador de correia               | 0,2 m <sup>3</sup> /h     | -                 |
| Esterilizador                          | 0,5 t/h                   | 1                 |
| Resfriador                             | 3 t/h                     | 1                 |
| Transportador helicoidal               | 0,2 m <sup>3</sup> /h     | -                 |

Fonte: elaborado pela autora.

### 5.2.2 Produção do inóculo

A etapa de produção do inóculo contempla as operações de mistura e inoculação, CES em biorreatores de bandeja, armazenamento, e transporte do substrato e do inóculo produzido. Previamente a todas essas operações, ocorre também uma etapa laboratorial responsável pela conservação e manutenção da cepa original do fungo e para produção das matrizes de trabalho, requeridas para inoculação do farelo de trigo. A etapa de produção do inóculo pode ser vista na Figura 11, anteriormente apresentada.

Nos laboratórios, a cepa original do fungo é mantida a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ , cujo acesso é restrito à pesquisa ou para a produção de novas matrizes de trabalho em casos de perda da vitalidade do fungo. As matrizes de trabalho são elaboradas em meio de cultura Batata-Dextrose-Ágar (BDA) e são usadas para fornecimento de esporos do fungo ao processo. A partir de uma matriz de trabalho, juntamente com a solução nutriente descrita por Zanelato et al. (2012), uma suspensão de esporos é obtida e terá sua concentração ajustada para  $10^7$  esporos/g.s.s.. A suspensão é então encaminhada para a inoculação do farelo, com umidade de 70%, em tambor rotativo de forma contínua.

A produção do inóculo a ser empregado no CES para a síntese das celulasas é feita em biorreatores de bandeja em três cultivos sucessivos, denominados 1G, 2G e 3G. Os esporos produzidos em 1G servem de inóculo ao 2G e os esporos gerados em 2G inoculam o 3G. O farelo inoculado é acomodado manualmente nas bandejas dos biorreatores, que são mantidos a uma temperatura de  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 96 horas. Estes biorreatores seguirão o conceito proposto por Ye et al. (2006), que empilhou várias bandejas em uma estrutura metálica, deixando um sobre-espaco sobre cada bandeja para escoamento de ar saturado. A estrutura foi colocada em uma câmara de temperatura controlada.

Após ser extraído do meio de cultivo BDA, a suspensão de esporos ajustada para a concentração de  $10^7$  esporos/g.s.s. para a inoculação do 1G. O farelo cultivado do 1G será misturado ao farelo do 2G, com 9 vezes mais farelo que a porção 1G, repetindo-se a operação para o 3G, que por sua vez, possui 9 vezes mais farelo que a porção 2G. Ao final de cada cultivo sucessivo, espera-se um fator de multiplicação de  $10^4$  vezes. O farelo cultivado resultante de cada cultivo será mantido em tanques pulmão refrigerados até a sua utilização por, no máximo, 1 dia, a fim de evitar contaminação por outros microrganismos e desidratação (THOMPSON, 2014)(ROUNVEN, 2021).

Na Tabela 7 estão listados os equipamentos presentes nessa etapa de processamento, suas capacidades nominais e a quantidade de equipamentos necessários para atender o processo.

Tabela 7 - Equipamentos para etapa de produção do inóculo.

| <b><i>Linha inóculo 1G</i></b> |                           |                   |
|--------------------------------|---------------------------|-------------------|
| <i>Equipamento</i>             | <i>Capacidade nominal</i> | <i>Quantidade</i> |
| Tambor rotativo                | 0,46 kg/h                 | 2                 |
| Biorreator de bandeja          | 1 m x 1 m                 | 4                 |
| Tanque pulmão                  | 0,05 m <sup>3</sup>       | 2                 |
| Transportador helicoidal       | 0,002 m <sup>3</sup> /h   | -                 |
| <b><i>Linha inóculo 2G</i></b> |                           |                   |
| <i>Equipamento</i>             | <i>Capacidade nominal</i> | <i>Quantidade</i> |
| Tambor rotativo                | 4,6 kg/h                  | 2                 |
| Transportador helicoidal       | 0,02 m <sup>3</sup> /h    | -                 |
| Biorreator de bandeja          | 1 m x 1 m                 | 4                 |
| Tanque pulmão                  | 0,5 m <sup>3</sup>        | 2                 |
| <b><i>Linha inóculo 3G</i></b> |                           |                   |
| <i>Equipamento</i>             | <i>Capacidade nominal</i> | <i>Quantidade</i> |
| Tambor rotativo                | 46 kg/h                   | 2                 |
| Transportador helicoidal       | 0,2 m <sup>3</sup> /h     | -                 |
| Biorreator de bandeja          | 1 m x 1 m                 | 28                |
| Tanque pulmão                  | 2,5 m <sup>3</sup>        | 4                 |

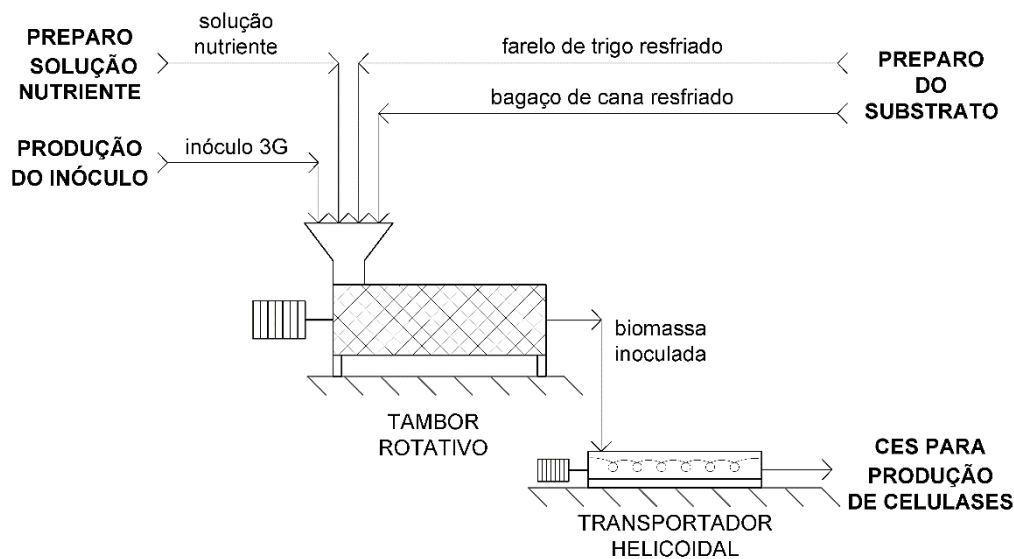
Fonte: elaborado pela autora.

### 5.2.3 Mistura e inoculação

A terceira etapa apresentada, contempla as operações de mistura e inoculação para obtenção da biomassa inoculada para a produção das enzimas celulolíticas. Para isso, as porções requeridas de bagaço de cana e farelo de trigo resfriados e parcialmente secos, inóculo 3G e solução nutriente são encaminhadas para um

tambor rotativo, onde o material será homogeneizado a fim de produzir uma biomassa inoculada com teor de umidade de 75%. Por fim, o envio do material até o biorreator de leito empacotado é feito continuamente por transportadores helicoidal. A Figura 13 traz um recorte da etapa mistura e inoculação retratada do fluxograma de processo.

Figura 13 - Fluxograma de processo da etapa de mistura e inoculação da PPE.



Fonte: elaborado pela autora.

Na Tabela 8, os equipamentos presentes nessa etapa de processamento, suas capacidades nominais e a quantidade de equipamentos necessários para atender o processo são apresentados.

Tabela 8 - Equipamentos para etapa de mistura e inoculação.

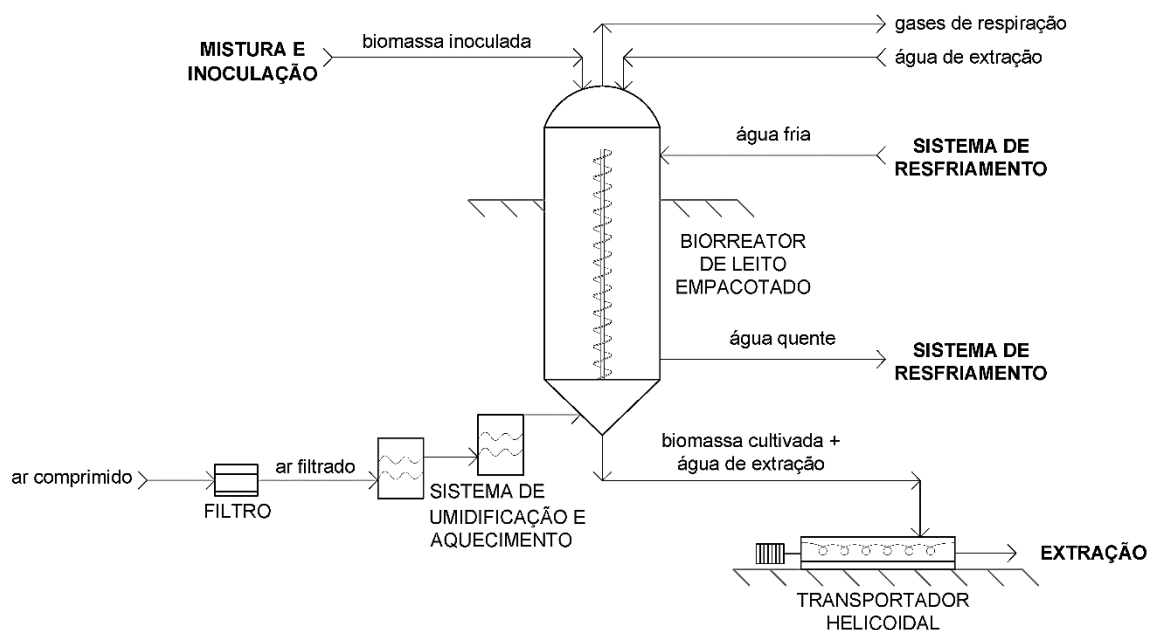
| <i>Equipamento</i>       | <i>Capacidade nominal</i> | <i>Quantidade</i> |
|--------------------------|---------------------------|-------------------|
| Tambor rotativo          | 6 t/h                     | 2                 |
| Transportador helicoidal | 20 m <sup>3</sup> /h      | -                 |
| Tanque                   | 7 m <sup>3</sup>          | 2                 |
| Bomba centrífuga         | 3,5 m <sup>3</sup> /h     | 4                 |

Fonte: elaborado pela autora.

#### 5.2.4 Cultivo em estado sólido para produção de celulases

A quarta etapa, contempla a operação de CES para a produção das enzimas celulolíticas. Em conjunto com a operação principal estão presentes dois sistemas que auxiliam na manutenção das condições ótimas de cultivo, o sistema de injeção de ar umidificado e aquecido a 45 °C, e o sistema de circulação de água de resfriamento pela camisa do biorreator. A Figura 14 traz um recorte da etapa cultivo em estado sólido retratada do fluxograma de processo.

Figura 14 - Fluxograma de processo da etapa de cultivo em estado sólido para produção de celulases da PPE.



Fonte: elaborado pela autora.

A biomassa inoculada que chega até o biorreator durante o carregamento é distribuída e se acomoda dentro do equipamento pelo auxílio da rosca sem fim instalada no centro do equipamento. Essa peça é adicionada ao projeto do biorreator com o intuito de mover a biomassa contribuir na sua sustentação ao longo do processo, evitando compactação. Da mesma forma espera-se utilizar a estrutura da rosca sem fim para injeção de ar umidificado em diversos pontos por toda a extensão do biorreator, de modo a promover a remoção do calor metabolicamente gerado. Um

tempo de carregamento de 5 horas é adotado com base na vazão de biomassa inoculada processada na etapa anterior.

Durante o cultivo, gases de respiração, formados em consequência do crescimento microbiano, são retirados na parte superior. Após 96 horas de cultivo, o descarregamento do biorreator tem início com entrada de água para a extração das enzimas num volume correspondente a 10 mL/g.s.s. (DE OLIVEIRA et al., 2020; RODRIGUES, 2020). A água de extração entra no biorreator apenas para auxiliar na desagregação da biomassa cultivada, juntamente com a movimentação da rosca sem fim. Tanto a água quanto a biomassa cultivada são então encaminhados para extração na etapa seguinte com a ajuda de um transportador helicoidal. O tempo estimado para essa operação é de 2,5 horas. Após o descarregamento o biorreator passa por uma limpeza e esterilização (CIP), devendo estar pronto para ser carregado novamente dentro de 2,5 horas. O número de total de biorreatores instalados se deu com base na disponibilidade diária de bagaço de cana que seria processado pela planta, levou-se em consideração também que o tempo de carregamento e descarregamento de deveriam estar contidos nos turnos de trabalho de 8 horas dos operadores.

Na Tabela 9 são listados os equipamentos presentes nessa etapa de processamento, suas capacidades nominais e a quantidade de equipamentos necessários para atender o processo.

Tabela 9 - Equipamentos para etapa de cultivo em estado sólido para produção de celulasas.

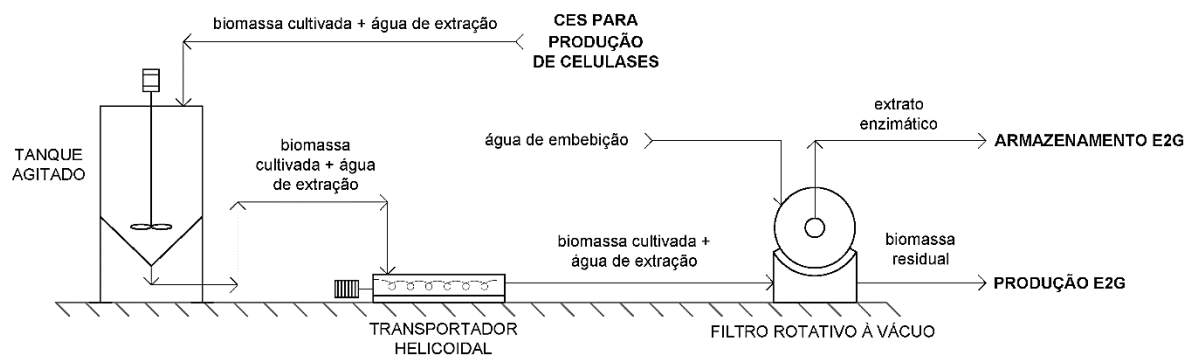
| <i>Equipamento</i>             | <i>Capacidade nominal</i> | <i>Quantidade</i> |
|--------------------------------|---------------------------|-------------------|
| Biorreator de leito empacotado | 150 m <sup>3</sup>        | 20                |
| Transportador helicoidal       | 170 m <sup>3</sup> /h     | 20                |
| Bomba centrífuga               | 70 m <sup>3</sup> /h      | 1                 |
| Tanque de água de extração     | 80 m <sup>3</sup> /h      | 1                 |

Fonte: elaborado pela autora.

### 5.2.5 Extração

A etapa de extração contempla as operações de agitação e filtração do material que é transportado do biorreator no descarregamento, após o termino do cultivo. A biomassa cultivada junto da água de extração é transportada até o tanque com agitação contínua com tempo de residência de 30 minutos. Um transportador helicoidal encaminha o material para um filtro rotativo a vácuo para separação do extrato enzimático da biomassa residual. A biomassa residual contendo cerca de 70% de umidade é encaminhada para processo de produção de E2G, enquanto o extrato é encaminhado para um tanque de passagem e bombeado para o armazenamento e uso na planta de E2G. A Figura 15 traz um recorte da etapa de extração retratada do fluxograma de processo.

Figura 15 - Fluxograma de processo da etapa de extração da PPE.



Fonte: elaborado pela autora.

Na Tabela 10 listados os equipamentos presentes nessa etapa de processamento, suas capacidades nominais e a quantidade de equipamentos necessários para atender o processo.

Tabela 10 - Equipamentos para etapa de extração.

| <i>Equipamento</i>       | <i>Capacidade nominal</i> | <i>Quantidade</i> |
|--------------------------|---------------------------|-------------------|
| Tanque agitado           | 90 m <sup>3</sup>         | 2                 |
| Transportador helicoidal | 85 m <sup>3</sup> /h      | 2                 |
| Filtro rotativo à vácuo  | 98 m <sup>2</sup>         | 3                 |
| Tanque de passagem       | 50 m <sup>3</sup>         | 1                 |
| Bomba centrífuga         | 40 m <sup>3</sup> /h      | 2                 |

Fonte: elaborado pela autora.

## 6 DISCUSSÕES SOBRE A PROPOSIÇÃO ATUAL

Os fluxogramas de processo apresentados na seção anterior (Figura 10 e 11), resume escolhas feitas a fim de superar os principais desafios envolvidos na implantação de um processo de CES para produção de enzimas celulolíticas em escala industrial. Nesta seção, comentam-se essas escolhas, os equipamentos propostos e selecionados para aplicação no processo, assim como outras possibilidades existentes e pesquisadas para resolução desses mesmos gargalos industriais.

Em primeiro lugar, deu-se a escolha de conduzir o processo de forma contínua tanto quanto fosse possível em cada uma das etapas. Um processamento contínuo, está menos sujeito a contaminação, requer menor mão de obra, e possui uma quantidade menor de tempos mortos entre as operações (EDGAR; HIMMELBLAU; LASDON, 2001; SKOGESTAD, 2008; DE JONG; VAN OMMEN, 2014). Dessa forma, para etapas cujo os equipamentos ainda eram operados a batelada, quais sejam CES para produção do inóculo e CES para produção das enzimas celulolíticas, o processo foi adaptado para que esses tempos se ajustassem, resultando, de modo geral, em um processo contínuo com algumas etapas em batelada.

Dentro da etapa de preparo do substrato, o modelo de esterilizador apresentado foi idealizado a partir de um equipamento conhecido como expensor, o qual possui aplicação dentro da indústria de fabricação de ração animal, atuando no cozimento e esterilização do material por um processo HTST (High Temperature Short Time) (FERRAZ, 2016). O equipamento é composto por uma rosca sem fim e um canhão, no qual pode ser introduzido vapor saturado, e tem sua pressão de atuação controlada por um pistão hidráulico ao fim do equipamento. A atuação do esterilizador foi concebida de forma similar e para um projeto mais detalhado desse tipo de equipamento são necessários estudos mais aprofundados acerca da pressão aplicável para que o tempo de residência dentro do equipamento, correspondente ao tempo de esterilização, possa ser determinado. Outra alternativa possível, e mais comumente aplicada, seria executar a esterilização dos materiais em autoclaves, num processo em batelada. Todavia, o volume de material a ser processado exigiria desenhos especiais destas autoclaves para que a temperatura fosse uniforme dentro da câmara e a esterilização fosse eficiente. Previu-se ainda a necessidade de se operar várias autoclaves simultaneamente, para que o processo como um todo

permanecesse contínuo, e os tempos perdidos na carga, descarga e reinício da operação afetariam a produtividade. Desta forma a escolha do equipamento idealizado a partir do expensor é justificável, apesar dos desafios de engenharia impostos à sua operação.

Ainda na etapa de preparado do substrato, o uso do resfriador em tambor rotativo, também veio como um exemplo de equipamento comumente implantado na indústria de alimentos. Basicamente é constituído de um cilindro circular horizontal, ligeiramente inclinado que gira em torno de seu eixo longitudinal (CAVICHIOLO, 2010). Para o resfriamento dos substratos estabeleceu-se um fluxo de entrada em co-corrente com o ar seco resfriado. Temperatura e umidades de saída dos materiais foram fixados a fim de simplificar o balanço de massa desta etapa, uma vez que o balanço energético não foi contemplado nesse trabalho. Neste equipamento, o resfriamento dos sólidos particulados se daria por troca convectiva de calor com o ar e remoção de calor devido à evaporação. Em Giudice et al. (2019), os autores procederam à secagem de quatro tipos distintos de biomassa provenientes de resíduos agroindustriais em um secador rotativo com volume de 2,5 m<sup>3</sup>, obtendo resultados satisfatórios, e observando que as características da biomassa mostraram influenciar os parâmetros técnicos do processo de secagem. Outra opção de se proceder o resfriamento desses substratos é encontrada na indústria de *koji*, onde o arroz, após o seu cozimento, é resfriado durante o transporte em esteiras, com resfriamento natural em leito fixo. Contudo, devido ao volume de material a ser processado, seria necessário o emprego de convecção forçada de ar através da camada estacionária de partículas movendo-se com a esteira. A velocidade do ar seria limitada pela possibilidade de arraste das partículas, de modo que a extensão de esteira perfurada com escoamento cruzado de ar seria muito grande para que os sólidos chegassem aos biorreatores na temperatura desejada. Ressalte-se que a camada de material sobre as esteiras não poderia ser muito espessa para que o resfriamento fosse efetivo e uniforme. Assim, a utilização dos tambores rotativos é favorável, pois este equipamento permite um contato íntimo entre as partículas e o ar.

Com relação a etapa supracitada, um estudo apresentado por El-Bakry et al. (2016) aponta para possibilidade de se conduzir a inoculação de biomassa não esterelizada para produção de enzimas por CES. Os autores testaram a inoculação de um microrganismo termofílico em ambiente não estéril tanto em escala laboratorial quanto em escala de bancada, e concluíram que o aumento de escala para esse tipo

de cultivo pode ocorrer sem que haja necessidade de esterilização prévia do meio de cultivo, sendo a temperatura um parâmetro chave para ampliação da escala de cultivo. Diante dessa perspectiva, o estudo de uma abordagem semelhante, conforme os parâmetros do projeto apresentado neste trabalho, contemplando a inoculação de fungos termófilos em um ambiente não estéril é fundamental para redução dos custos de produção das celulases, uma vez que, não foram encontrados estudos prévios sobre o assunto na literatura.

Com o objetivo de diminuir os custos do processo e levando-se em conta a melhor adaptação dos fungos filamentosos, como o *Myceliophthora thermofila*, ao crescimento em um substrato sólido, o preparo do inóculo foi estruturado visando sua produção por CES, através de uma escala de cultivo que é progressivamente aumentada até a quantidade suficiente para inoculação da biomassa que adentra o biorreator de leito empacotado no cultivo principal (CHEIRSILP; KITCHA, 2015; CERDA et al., 2016). A escolha do farelo de trigo como substrato visa uma boa adaptação do fungo, pois este material é considerado um bom indutor de crescimento de fungos por conter fontes balanceadas de carbono facilmente assimilável, nitrogênio e fósforo (PANDEY, 2003). Todavia, o cultivo em biorreator de leito empacotado utilizando apenas o farelo de trigo como substrato não apresentou bons resultados, devido à baixa porosidade do leito (CASCIATORI et al., 2014). Já o biorreator de bandeja mostrou-se uma opção de fácil aplicação e manuseio simples, com aplicação recorrente na indústria de *koji*. A fim de evitar compactação do material nas bandejas e consequente superaquecimento, fixou-se uma altura de 2,5 cm para o meio de cultivo nas bandejas projetadas (YE et al., 2006). A operação com biorreatores de bandeja apresenta, contudo, os seus desafios, principalmente pelo controle pouco refinado das variáveis de operação. A investigação da produção de inóculo em biorreatores de tambor com rotação intermitente é uma alternativa a ser estudada, mas seu custo mais elevado que os de bandeja e sua menor capacidade volumétrica levaram à escolha dos de bandeja. Ressalte-se que os biorreatores de tambor rotativo estão limitados a um grau de enchimento de 60% de seu volume (TADA; AGUDELO; THOMÉO, 2019).

Ademais, observou-se pelo balanço material que um inóculo final (3G) com uma concentração a baixo dos  $10^{13}$  esporos/g.s.s. resultaria em um maior consumo de farelo de trigo, que não fora projetado, e consequentemente uma maior quantidade equipamentos; dessa forma, adotou-se um fator de multiplicação  $10^4$  a cada geração.

Rodrigues (2020) avaliou em seus estudos três estratégias de inoculação sólido-sólido utilizando proporções variadas de bagaço de cana de farelo de trigo. Em termos absolutos, o número de esporos obtidos com esse tipo de inoculação apresentou resultados significativos. Ainda que um fator de multiplicação como o adotado neste estudo não tenha sido observado pela autora, os resultados iniciais obtidos sem qualquer tipo de aprimoramento, apontam caminho para o desenvolvimento das pesquisas quanto a quantificação dos esporos, a mistura dos substratos e proporções mais adequadas para esse tipo de cultivo.

Outras questões importantes quanto ao CES dizem respeito ao tempo mínimo necessário para obtenção de esporos viáveis que possam ser incorporados como inóculo do CES. Tempos menores do que as atuais 96 horas, representariam uma economia significativa nos custos operacionais; além disso, deve-se atentar para as consequências dos cultivos sucessivos que podem provocar perda da vitalidade do fungo e assim queda da produtividade da PPE.

Na etapa de mistura e inoculação, presente tanto no preparo do inóculo quanto na produção das enzimas, a dispersão e mistura eficientes do inóculo e da biomassa inoculada antes do cultivo são necessários para otimização de um crescimento homogêneo do fungo por todo o material. No processo apresentado, adotou-se tambores rotativos para execução da mistura e inoculação em um único equipamento de forma contínua. Foi projetado para essa forma de inoculação, a utilização de um inóculo com altas concentrações de esporos, o que contribui ainda mais na diminuição dos riscos de contaminação, uma vez que o meio se encontra colonizado pela cultura principal do fungo termófilo dificultando o estabelecimento de outras culturas microbianas.

As modificações mecânicas e estruturais apresentadas para o biorreator de leite empacotado foram inicialmente implantadas com o intuito de resolver os problemas de sustentação, carregamento e descarregamento do biorreator. A partir dos resultados obtidos por Perez et al. (2020), os quais apontavam a ação benéfica do uso de um tubo central perfurado para dispersão do ar saturado ao longo de toda a extensão do biorreator, adotou-se uma atuação semelhante para a rosca sem fim localizada na parte central do biorreator. Entretanto, este acessório, necessário à movimentação, areação e sustentação do meio de cultivo, limitou a capacidade volumétrica do biorreator em 65 % (LIMA, 2011). A adoção de sistema similar ao de Perez et al. (2020), com grades de sustentação dispostas ao longo do comprimento

do biorreator e vários tubos perfurados dispostos ao longo do eixo axial, traria inconvenientes para o carregamento e o descarregamento dos biorreatores, impactando o tempo de preparo do sistema de cultivo, embora tenham sido eficientes na escala adotada pelos autores. Quanto a capacidade dos biorreatores, o processo de obtenção de etanol por meio do CSm serviu como métrica para o volume adotado, no qual encontram-se equipamentos de até 600 m<sup>3</sup>. Uma alternativa ao valor selecionado seria a diminuição de sua escala, tendo em vista a redução de perdas por contaminação, em consequência, uma maior quantidade de equipamentos seriam necessários para suprir a demanda diária de produção - pelo balanço de massa a redução do volume de operação para um valor de 5 m<sup>3</sup> resultaria em aproximadamente 150 biorreatores por dia.

Para extração, a opção de utilizar uma menor taxa de extração (10 mL/g.s.s.) resultou em uma maior atividade enzimática por volume de extrato enzimático produzido pela PPE, comparado ao obtido por Mendes (2015), que considerou em seu processo uma taxa de extração maior (20 mL/g.s.s.) e um processo de concentração capaz de reduzir em 70 % o volume do extrato enzimático diluído. Apesar do resultado obtido, não é uma tarefa simples operar com uma razão de água de extração tão baixa quanto a que foi proposta neste trabalho, pois a interação sólido-água é limitada, tornando necessário um tempo mais longo de extração e um sistema de agitação que proporcione uma mistura intensa sólido-água. Ainda assim, uma vez que os problemas de engenharia do tanque de agitação e a otimização da filtragem em filtro rotativo a vácuo forem resolvidos, o processo teria possibilidade de apresentar aumento significativo da atividade enzimática. Uma opção a extração aqui considerada pode ser encontrada em De Oliveira et al. (2020). Nesse estudo, os autores desenvolveram um processo de extração por percolação, onde cada módulo do biorreator foi colocado em uma coluna de extração, no qual a água destilada circulava e fazia a percolação do material cultivado. Uma recuperação de 85% da atividade enzimática total foi obtida por percolação através de um tempo de contato de 120 minutos e vazão de 2,4 m<sup>3</sup>/h. De um modo geral, a extração das enzimas apresentou bons resultados, todavia, devido aos maiores volumes de água adotado para extração, os extratos obtidos possuíam menores concentrações. Em um último teste os autores procederam ainda a extração para quatro módulos cultivados com *M. thermophila*, utilizando vazão 2.400 L/h por 30 minutos e 27 mL/g, onde o mesmo líquido (água destilada) percolou todos os módulos sem que houvesse renovação de

volume. Os resultados indicaram que essa estratégia não era adequada para extração por percolação devido à saturação do líquido. Para o biorreator proposto no presente trabalho, prevê-se que a rosca sem fim do interior do equipamento possa dificultar a extração.

Para o direcionamento da biomassa residual, optou-se pelo seu encaminhamento para planta produtora de E2G. A partir do material cultivado, a recuperação de celulose é que cerca de 90% (HEINZLE; BIWER; COONEY, 2007), de modo que a biomassa vegetal permanece similar à que entra no E2G, à exceção do farelo de trigo. Deste modo, a biomassa cultivada deverá ser encaminhada para pré-tratamento juntamente com o bagaço de cana destinado ao E2G. Uma outra opção seria a queima deste material para a produção de energia, mas devido ao alto teor de umidade, a eficiência das caldeiras seria afetada. Além disso, esse material cultivado poderia ser destinado à alimentação animal, compondo o conteúdo proteico de rações animais, mas estudos mais profundos de zootecnia necessitam comprovar o valor nutricional deste material (MENDES, 2015).

Uma alternativa aos processos de extração e encaminhamento dos resíduos é apresentada pelas pesquisadoras em Pirota et al. (2014). As autoras empregaram todo o meio cultivado por CES de três tipos diferentes de fungos filamentosos, juntamente com seus extratos enzimáticos, para hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar previamente explodido por vapor, obtendo taxas de conversão de biomassa por volta dos 65 %. A configuração simplificada apresentada permite o uso de um único reator, evitando etapas adicionais também na produção de E2G. Potencialmente válida essa abordagem precisa ainda de maiores estudos, principalmente ligados ao aumento de escala. Além disso, a existência dos resíduos lignocelulósicos não é completamente eliminada, uma vez que estes devem ser separados e direcionados após a produção de etanol.

Finalmente, um aspecto fundamental a ser observado trata-se da aplicação do extrato enzimático obtido para hidrólise de bagaço de cana na planta de E2G. Para essa análise, foram utilizados os dados obtidos em Casciatori (2015b). Neste estudo, o consumo de 5 mL de extrato enzimático / 0,2 g de bagaço pré-tratado, 6,8 horas de hidrólise, resultou em uma liberação máxima de ART igual a 51,7 mg de ART / g de bagaço pré-tratado. Considerando que todo o açúcar liberado seja glicose, a proporção de 0,65 mL de etanol / g de glicose fermentada foi utilizada para o cálculo do rendimento em litros de etanol. A aplicação desses números pode ser encontrada

no Apêndice A. Como resultado, o extrato enzimático produzido é capaz de diariamente hidrolisar 36,15 toneladas de bagaço pré-tratado, resultando em uma produção de 1.215 L etanol / dia. Diante desses dados, temos que o extrato enzimático produzido com base nos parâmetros adotados para PPE é capaz de hidrolisar cerca de 10 % do total de bagaço de cana disponível por safra. A ausência de um processo de concentração do extrato enzimático pode explicar em parte esse rendimento, todavia, tal processo resultaria em maiores gastos. Resalta-se assim a importância de estudos que busquem a produção de enzimas celulolíticas com maiores atividades enzimática, como uma peça chave para a viabilidade econômica para implantação da PPE (MENDES; ATALA; THOMÉO, 2017).

## 7 CONCLUSÃO

Por meio do fluxograma de processo apresentado, o presente trabalho identificou e apontou soluções para os principais gargalos operacionais relacionados a estruturação de um processo de produção de enzimas celulolíticas por CES em biorreatores de leito empacotado integrado as produções de E1G e E2G. O balanço material executado possibilitou que se estabeleça-se a capacidade nominal dos equipamentos propostos, e sempre que possível o detalhamento destes e outros detalhes operacionais foram apresentados.

Para etapa de preparo dos substratos, definiu-se a forma de esterilização do bagaço de cana e do farelo trigo, através da operação contínua em uma rosca sem fim com a injeção de vapor saturado, e o resfriamento, ocorrendo em um tambor rotativo pela admissão de ar seco resfriado. Duas linhas de operação foram estabelecidas e os substratos processados separadamente.

Estabeleceu-se um processo de CES para a produção de inóculo em biorreatores de bandeja, utilizando o farelo de trigo como substrato. Este cultivo foi dividido em três etapas que progressivamente aumentavam em massa e em quantidade de esporos até composição necessária do inóculo final.

A mistura e inoculação da biomassa foram configuradas para ocorrer continuamente em tambor rotativo, e encaminhados o CES para produção de enzimas celulolíticas com o auxílio de transportadores helicoidais. Para os biorreatores de leito empacotado, propôs-se a instalação de uma rosca sem fim em seu interior para auxiliar no carregamento, descarregamento e estruturação da biomassa durante o cultivo, além de prover ar ao sistema.

Quanto a extração líquida das enzimas, determinou-se o emprego de um tanque agitado, com a separação da biomassa sólida residual ocorrendo por filtração a vácuo em tambor rotativo. O extrato enzimático obtido foi encaminhado para armazenamento e consumo iminente na planta de E2G, assim como a biomassa residual por ainda conter quantidade significativa de material não hidrolisado.

Por fim, a planta produtora de enzimas celulolíticas, foi projetada com um total de 20 biorreatores de leito empacotado de 150 m<sup>3</sup> cada, apresentando uma atividade enzimática total de 8,45x10<sup>10</sup> FPU por safra e um total de 4,59x10<sup>5</sup> FPU por metro cúbico de extrato enzimático líquido obtido por safra, cuja aplicação calculada atende cerca de 10 % da demanda de bagaço de cana disponível para hidrólise por safra.

De maneira geral, tanto o balanço material quanto o fluxograma de processo apresentados nesse trabalho dão andamento as pesquisas voltadas para o desenvolvimento de uma produção industrial de enzimas celulolíticas por CES. Os detalhes operacionais descritos servem para ampliar as perspectivas tanto do planejamento e estruturação da planta, quanto para dimensionar, de forma mais efetiva, os desafios a serem enfrentados para o estabelecimento de um processo em larga escala.

## 8 TRABALHOS FUTUROS

No sentido de aprimorar a estrutura apresentada para o processo de produção industrial *in-house* de enzimas celulolíticas por CES, como continuação do presente trabalho, propõem-se:

- Executar o balanço energético e um estudo de integração da PPE com as produções de E1G e E2G a fim de tornar o processo de obtenção dessas enzimas uma alternativa mais competitiva do ponto de vista econômico;
- Conduzir um novo estudo econômico, conforme feito por Mendes et al. (2017) para contemplar as novas alternativas de processo apresentadas, assim como os novos valores de atividades enzimáticas existentes na literatura;
- Estudar e testar a condição de operação relacionada com a não esterilização dos substratos antes da inoculação e seus efeitos quanto ao crescimento do microrganismo e a produção das enzimas celulolíticas;
- Aprimorar os estudos e testes relacionados a inoculação sólido-sólido do meio de cultivo, buscando conhecer a cinética de esporulação do fungo, sua capacidade de crescimento e produção de enzimas ao longo de cultivos sucessíveis, assim como, avaliar novas composições de substratos para produção de inóculo sólido;
- Estudar e avaliar a aplicação direta da biomassa cultivada pelo fungo *Myceliophthora thermophila* I-1D3b no processo de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar.

## REFERÊNCIAS

ADITIYA, H. B. et al. Second generation bioethanol production: A critical review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 66, p. 631–653, 2016.

ALBARELLI, J. Q.; ENSINAS, A. V.; SILVA, M. A. Product diversification to enhance economic viability of second generation ethanol production in Brazil: The case of the sugar and ethanol joint production. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 92, n. 8, p. 1470–1481, 2014.

BON, E. et al. **Sustainable degradation of biomass - Techniques, lignocellulosic applications and commercialization**. 1. ed. Rijeka, Croacia: InTech, 2013.

CASCIATORI, F. P. et al. Structural properties of beds packed with agro-industrial solid by-products applicable for solid-state fermentation: Experimental data and effects on process performance. **Chemical Engineering Journal**, v. 255, p. 214–224, 2014.

CASCIATORI, F. P. **Produção de celulases fúngicas por fermentação em estado sólido : ampliação de escala de biorreatores de leito fixo**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2015a.

CASCIATORI, F. P. et al. Hygroscopic properties of solid agro-industrial by-products used in solid-state fermentation. **Industrial Crops and Products**, v. 64, p. 114–123, 2015a.

CASCIATORI, F. P. et al. Two-phase and two-dimensional model describing heat and water transfer during solid-state fermentation within a packed-bed bioreactor. **Chemical Engineering Journal**, v. 287, p. 103–116, 2016.

CASCIATORI, F. P.; THOMÉO, J. C. Heat transfer in packed-beds of agricultural waste with low rates of air flow applicable to solid-state fermentation. **Chemical Engineering Science**, v. 188, p. 97–111, 2018.

CASCIATORI, P. A. et al. **Sacarificação De Bagaço De Cana in Natura E Pré-Tratado Com Ozônio Por Enzimas Celulolíticas Produzidas Por Fungo Termofílico Em Cultivo Sólido**. Florianópolis: [s.n.].

CASCIATORI, P. A. **Produção de Enzimas Celulolíticas pelos fungos *Trichoderma reesei* e *Myceliophthora thermophila* e Aplicação na Sacarificação do Bagaço de Cana-de-Açúcar São José do Rio Preto** Priscila Aparecida Casciatori **Produção de Enzimas C.** [s.l.] Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2015b.

CAVICHIOLO, J. R. **Secagem do bagaço de laranja em secador tipo flash**. [s.l.] Unicamp, 2010.

CERDA, A. et al. Long term enhanced solid-state fermentation: Inoculation strategies for amylase production from soy and bread wastes by *Thermomyces* sp. in a sequential batch operation. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 4, n. 2, p. 2394–2401, 2016.

CHEIRSILP, B.; KITCHA, S. Solid state fermentation by cellulolytic oleaginous fungi for direct conversion of lignocellulosic biomass into lipids: Fed-batch and repeated-batch fermentations. **Industrial Crops and Products**, v. 66, p. 73–80, 2015.

CONAB. **Perfil Do Setor Do Açúcar E Do Alcool No Brasil - Safra 2011/2012**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <[https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/perfil-do-setor-sucroalcooleiro/item/download/23296\\_e8994bb0d8652261a47cf54ac4332120](https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/perfil-do-setor-sucroalcooleiro/item/download/23296_e8994bb0d8652261a47cf54ac4332120)>.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de cana -de-açúcar - Safra 2019/20 - Terceiro levantamento**. Brasília: Observatório Agrícola, 2020. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>>.

DE JONG, W.; VAN OMMEN, J. R. **Biomass as a sustainable energy source for the future: Fundamentals of conversion processes**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2014. v. 9781118304

DE OLIVEIRA, S. P. et al. Solid-liquid extraction of cellulases from fungal solid-state cultivation in a packed bed bioreactor. **Korean Journal of Chemical Engineering**, v. 37, n. 9, p. 1530–1540, 2020.

DIAS, M. O. DE S. **Simulação do processo de produção de etanol a partir do açúcar e do bagaço, visando a integração do processo e a maximização da produção de energia e excedentes do bagaço**. [s.l.] UNICAMP, 2008.

EDGAR, T. F.; HIMMELBLAU, D. M.; LASDON, L. S. **Optimization of chemical process**. 2° ed. [s.l.] McGraw-Hill, 2001.

EL-BAKRY, M.; GEA, T.; SÁNCHEZ, A. Inoculation effect of thermophilic microorganisms on protease production through solid-state fermentation under non-sterile conditions at lab and bench scale (SSF). **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, n. 4, p. 585–592, 2016.

EPE. **Balanço energético nacional -Ano base 2019**. rio de Janeiro: [s.n.]. Disponível em: <<https://www.epe.gov.br/pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/balanco-energetico-nacional-2020>>.

ESCRIVÁ, S. J. Caminho, “Carater”. In: **Caminho**. São Paulo: Quadrante, 1999. p. 1–8.

FARINAS, C. S.; FLORENCIO, C.; BADINO, A. C. On-Site Production of Cellulolytic Enzymes by the Sequential Cultivation Method. In: **Cellulases - Methods and Protocols**. New York, NY: Humana Press, 2018. v. 1796p. 273–282.

FERRAZ, M. E E. L. **O Expansor e suas funções na produção de ração!** Disponível em: <<http://www.ferrazmaquinas.com.br/conteudo/o-expansor-e-suas-funcoes-na-producao-de-racao-portal-r2s.html>>. Acesso em: 11 fev. 2021.

FLORENCIO, C.; BADINO, A. C.; FARINAS, C. S. Current challenges on the production and use of cellulolytic enzymes in the hydrolysis of lignocellulosic biomass. **Química Nova**, v. 40, n. 9, p. 1082–1093, 2017.

FONSECA, L. M.; PARREIRAS, L. S.; MURAKAMI, M. T. Rational engineering of the *Trichoderma reesei* RUT-C30 strain into an industrially relevant platform for cellulase production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 13, n. 1, p. 1–15, 2020.

FRASSATTO, P. A. C. et al. Fungal cellulases: production by solid-state cultivation in packed-bed bioreactor using solid agro-industrial by-products as substrates and application for hydrolysis of sugarcane bagasse. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 41, n. 5, p. 2097–2116, 2020.

FURLAN, F. F. **Desenvolvimento de ambiente integrado para simulação e otimização estática da produção de etanol a partir de bagaço de cana-de-açúcar por rota bioquímica**. [s.l.] UFSCar, 2012.

GIUDICE, A. DEL et al. Rotary Dryer. **MDPI**, v. 12, n. 1590, 2019.

GOMES, E. et al. Enzimas termoestáveis: Fontes, produção e aplicação industrial. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 136–145, 2007.

HEINZLE, E.; BIWER, A. P.; COONEY, C. L. **Development of Sustainable Bioprocesses: Modeling and Assessment**. Chichester: Wiley, 2007.

HÖLKER, U.; LENZ, J. Solid-state fermentation - Are there any biotechnological advantages? **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 301–306, 2005.

IPEA. **Quarenta anos de etanol em larga escala no Brasil : desafios, crises e perspectivas**. Brasília: Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada, 2016.

KARMAKAR, M.; RAY, R. R. Current Trends in Research and Application of Microbial Cellulases. **Research Journal of Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 43–53, 2011.

KUHAD, R. C. et al. Revisiting cellulase production and redefining current strategies based on major challenges. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 55, p. 249–272, 2016.

LIMA, C. A. F. DE. **Avaliação econômica do processo de produção de celulase através de cultivo em meio sólido**. [s.l.] Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2011.

LORENZI, B. R.; DE ANDRADE, T. H. N. Second generation ethanol in Brazil: Policies and socio-technical networks. **Revista Brasileira de Ciencias Sociais**, v. 34, n. 100, 2019.

MARQUES, F. Obstáculos no caminho. **Pesquisa Fapesp**, v. 268, p. 58–63, 2018.

MENDES, F. B. **Avaliação Técnico-Econômica da Produção de Enzimas Celulolíticas por Fermentação em Estado Sólido**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, 2015.

MENDES, F. B.; ATALA, D. I. P.; THOMÉO, J. C. Is cellulase production by solid-state fermentation economically attractive for the second generation ethanol production? **Renewable Energy**, v. 114, p. 525–533, 2017.

MILANEZ, A. Y. et al. De promessa a realidade : como o etanol celulósico pode revolucionar a indústria da cana-de-açúcar - uma avaliação do potencial competitivo e sugestões de política pública. **Biocombustíveis BNDES setorial**, v. 41, p. 237–294, 2015.

MITCHELL, D. A.; KRIEGER, N.; BEROVIČ, M. **Solid-State Fermentation Bioreactors: Fundamentals of Design and Operation**. Leipzig, Alemanha: Springer, 2006.

NACHILUK, K. **Cana-de-açúcar: produção e processamento em 2019 -Análises e Indicadores do Agronegócio**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.iea.sp.gov.br/out/TerTexto.php?codTexto=14767>>.

NIGAM, P. S. NEE'; PANDEY, A. **Solid-State Fermentation Technology for Bioconversion of Biomass and Agricultural Residues**. [s.l.] Springer, 2009.

NOVELLO, M. et al. Enzymes for second generation ethanol: Exploring new strategies for the use of xylose. **RSC Advances**, v. 4, n. 41, p. 21361–21368, 2014.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 13, n. 2–3, p. 81–84, 2003.

PAVANI, H. L. **Usina Colombo S/A - Apresentação STAB 2018**. Ariranha: [s.n.]. Disponível em: [http://www.stab.org.br/19sba\\_palestras/18\\_sba19\\_helio\\_pavani\\_usina\\_colombo.pdf](http://www.stab.org.br/19sba_palestras/18_sba19_helio_pavani_usina_colombo.pdf) >.

PEREZ, C. L. **Avaliação da viabilidade técnica da ampliação de escala da produção de enzimas celulolíticas e hemicelulolíticas por FES em biorreatores de leito empacotado**. [s.l.] UNESP, 2017.

PEREZ, C. L.; CASCIATORI, F. P.; THOMÉO, J. C. Strategies for scaling-up packed-bed bioreactors for solid-state fermentation: The case of cellulolytic enzymes production by a thermophilic fungus. **Chemical Engineering Journal**, v. 361, n. July 2018, p. 1142–1151, 2019.

PEREZ, C. L.; CASCIATORI, F. P.; THOMÉO, J. C. Improving enzyme production by solid-state cultivation in packed-bed bioreactors by changing bed porosity and airflow distribution. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, n. 0123456789, 2020.

PIROTA, R. D. P. B.; DELABONA, P. S.; FARINAS, C. S. Simplification of the Biomass to Ethanol Conversion Process by Using the Whole Medium of Filamentous Fungi Cultivated Under Solid-State Fermentation. **Bioenergy Research**, v. 7, n. 2, p. 744–752, 2014.

QUIROZ-CASTAÑEDA, R. E.; FOLCH-MALLOL, J. L. Hydrolysis of Biomass Mediated by Cellulases for the Production of Sugars. In: **Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization**. Cuernavaca: IntechOpen, 2013. p. 119–155.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 3, p. 114–140, 1998.

RODRIGUES, N. A. **Produção de celulases em biorrefinarias por fermentação em estado sólido em biorreatores de leito empacotado**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2020.

ROUNVEN. **How to Store and Transport Your Mushrooms Properly - Improve Mushroom Cultivation**. Disponível em: <<https://improvemushroomcultivation.com/store-and-transport-your-mushrooms/>>.

SANDGREN, M.; STÅHLBERG, J.; MITCHINSON, C. Structural and biochemical studies of GH family 12 cellulases: Improved thermal stability, and ligand complexes. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 89, n. 3, p. 246–291, 2005.

SHIOTA, V. M. **Secagem de celulases de origem fungica por spray-drying**. [s.l.] UNESP, 2014.

SIQUEIRA, J. G. W. et al. Current advances in on-site cellulase production and application on lignocellulosic biomass conversion to biofuels: A review. **Biomass and Bioenergy**, v. 132, n. October 2019, p. 105419, 2020.

SKOGESTAD, S. **Chemical and Energy Process Engineering**. [s.l.] CRC Press, 2008.

STEPHENS, E. et al. An economic and technical evaluation of microalgal biofuels. **Nature Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 126–128, 2010.

TADA, É. F. R.; AGUDELO, L. M. G.; THOMÉO, J. C. Water holding capacity and heat transfer aspects of a mixture of sugar cane bagasse and wheat bran in a partially filled rotating drum. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, n. 3, p. 1131–1141, 2019.

THOMPSON, A. K. **Mushrooms - Cargo Handbook - the world's largest cargo transport guidelines website.** Disponível em: <<https://cargohandbook.com/index.php/Mushrooms>>.

VASCONCELOS, Y. O desafio de gerar bioenergia. **Revista Fapesp**, p. 65–67, 2019.

WEBB, C.; MANAN, M. A. Design Aspects of Solid State Fermentation as Applied to Microbial Bioprocessing. **Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering**, v. 4, n. 1, p. 25, 2017.

YE, S. D. et al. New solid-state fermentation chamber for bulk production of aerial conidia of fungal biocontrol agents on rice. **Biotechnology Letters**, v. 28, n. 11, p. 799–804, 2006.

ZANELATO, A. I. et al. Endoglucanase production with the newly isolated. **Brazilian Journal of Microbiology**, p. 1536–1544, 2012.

## APÊNDICE A – Balanço material para as etapas da PPE

### Produção de inóculo - concentração de esporos

| Descrição                                         | Valor       | Unidade          |
|---------------------------------------------------|-------------|------------------|
| <i>Concentração de esporos necessária (safra)</i> | 6,76297E+16 | esporos / g.s.s. |
| <i>Concentração de esporos necessária (dia)</i>   | 3,31518E+14 | esporos / g.s.s. |
| <i>Concentração de esporos necessária (hora)</i>  | 1,38133E+13 | esporos / g.s.s. |

### Produção de inóculo - matéria seca

| Descrição                              | Valor       | Unidade      |
|----------------------------------------|-------------|--------------|
| <i>FT seco para cultivo 3G (safra)</i> | 67,62971429 | t.s.s./safra |
| <i>FT seco para cultivo 3G (dia)</i>   | 0,331518207 | t.s.s./dia   |
| <i>FT seco para cultivo 3G (hora)</i>  | 0,013813259 | t.s.s./h     |
| <i>FT seco para cultivo 2G (safra)</i> | 6,762971429 | t.s.s./safra |
| <i>FT seco para cultivo 2G (dia)</i>   | 0,033151821 | t.s.s./dia   |
| <i>FT seco para cultivo 2G (hora)</i>  | 0,001381326 | t.s.s./h     |
| <i>FT seco para cultivo 1G (safra)</i> | 0,676297143 | t.s.s./safra |
| <i>FT seco para cultivo 1G (dia)</i>   | 0,003315182 | t.s.s./dia   |
| <i>FT seco para cultivo 1G (hora)</i>  | 0,000138133 | t.s.s./h     |

### Produção de inóculo - matéria in natura

| Descrição                                   | Valor       | Unidade |
|---------------------------------------------|-------------|---------|
| <i>FT in natura para cultivo 3G (safra)</i> | 84,53714286 | t/safra |
| <i>FT in natura para cultivo 3G (dia)</i>   | 0,414397759 | t/dia   |
| <i>FT in natura para cultivo 3G (hora)</i>  | 0,017266573 | t/h     |
| <i>FT in natura para cultivo 2G (safra)</i> | 8,453714286 | t/safra |
| <i>FT in natura para cultivo 2G (dia)</i>   | 0,041439776 | t/dia   |
| <i>FT in natura para cultivo 2G (hora)</i>  | 0,001726657 | t/h     |
| <i>FT in natura para cultivo 1G (safra)</i> | 0,845371429 | t/safra |
| <i>FT in natura para cultivo 1G (dia)</i>   | 0,004143978 | t/dia   |
| <i>FT in natura para cultivo 1G (hora)</i>  | 0,000172666 | t/h     |

### Produção de inóculo - solução nutriente umidificação para umidificação até 70% de umidade

| Descrição                                                | Valor       | Unidade  |
|----------------------------------------------------------|-------------|----------|
| <i>Solução Nutriente para umidificação FTN3G (safra)</i> | 140,8952381 | t/safra  |
|                                                          | 140,8952381 | m³/safra |
| <i>Solução Nutriente para umidificação FTN3G (dia)</i>   | 0,690662932 | t/dia    |
|                                                          | 0,690662932 | m³/dia   |

|                                                          |             |          |
|----------------------------------------------------------|-------------|----------|
| <i>Solução Nutriente para umidificação FTN3G (hora)</i>  | 0,028777622 | t/h      |
|                                                          | 0,028777622 | m³/h     |
| <i>Solução Nutriente para umidificação FTN2G (safra)</i> | 14,08952381 | t/safra  |
|                                                          | 14,08952381 | m³/safra |
| <i>Solução Nutriente para umidificação FTN2G (dia)</i>   | 0,069066293 | t/dia    |
|                                                          | 0,069066293 | m³/dia   |
| <i>Solução Nutriente para umidificação FTN2G (hora)</i>  | 0,002877762 | t/h      |
|                                                          | 0,002877762 | m³/h     |
| <i>Solução Nutriente para umidificação FTN1G (safra)</i> | 1,408952381 | t/safra  |
|                                                          | 1,408952381 | m³/safra |
| <i>Solução Nutriente para umidificação FTN1G (dia)</i>   | 0,006906629 | t/dia    |
|                                                          | 0,006906629 | m³/dia   |
| <i>Solução Nutriente para umidificação FTN1G (hora)</i>  | 0,000287776 | t/h      |
|                                                          | 0,000287776 | m³/h     |

#### **Produção de inóculo - matéria umidificada**

| <b>Descrição</b>                              | <b>Valor</b> | <b>Unidade</b> |
|-----------------------------------------------|--------------|----------------|
| <i>FT umidificado para cultivo 3G (safra)</i> | 225,432381   | t/safra        |
|                                               | 957,6683116  | m³/safra       |
| <i>FT umidificado para cultivo 3G (dia)</i>   | 1,105060691  | t/dia          |
|                                               | 4,694452508  | m³/dia         |
| <i>FT umidificado para cultivo 3G (hora)</i>  | 0,046044195  | t/h            |
|                                               | 0,195602188  | m³/h           |
| <i>FT umidificado para cultivo 2G (safra)</i> | 22,5432381   | t/safra        |
|                                               | 95,76683116  | m³/safra       |
| <i>FT umidificado para cultivo 2G (dia)</i>   | 0,110506069  | t/dia          |
|                                               | 0,469445251  | m³/dia         |
| <i>FT umidificado para cultivo 2G (hora)</i>  | 0,00460442   | t/h            |
|                                               | 0,019560219  | m³/h           |
| <i>FT umidificado para cultivo 1G (safra)</i> | 2,25432381   | t/safra        |
|                                               | 9,576683116  | m³/safra       |
| <i>FT umidificado para cultivo 1G (dia)</i>   | 0,011050607  | t/dia          |
|                                               | 0,046944525  | m³/dia         |
| <i>FT umidificado para cultivo 1G (hora)</i>  | 0,000460442  | t/h            |
|                                               | 0,001956022  | m³/h           |

#### **Planta produtora de enzimas celulolíticas - Farelo de trigo real**

| <b>Descrição</b>                            | <b>Valor</b> | <b>Unidade</b> |
|---------------------------------------------|--------------|----------------|
| <i>FT real planta de celulase seco</i>      | 1961,261714  | t.s.s./safra   |
| <i>FT real planta de celulase seco dia</i>  | 9,614028011  | t.s.s./dia     |
| <i>FT real planta de celulase seco hora</i> | 0,4005845    | t.s.s./h       |
| <i>FT real planta de celulase in natura</i> | 2451,577143  | t/safra        |

|                                                  |             |       |
|--------------------------------------------------|-------------|-------|
| <i>FT real planta de celulase in natura dia</i>  | 12,01753501 | t/dia |
| <i>FT real planta de celulase in natura hora</i> | 0,500730626 | t/h   |

**Planta produtora de enzimas celulolíticas - Solução nutriente umidificação até 75% de umidade**

| Descrição                                                   | Valor     | Unidade  |
|-------------------------------------------------------------|-----------|----------|
| <i>Solução Nutriente para umidificação Biomassa (safra)</i> | 14.906,72 | t/safra  |
|                                                             | 14.906,72 | m³/safra |
| <i>Solução Nutriente para umidificação Biomassa (dia)</i>   | 73,07     | t/dia    |
|                                                             | 73,07     | m³/dia   |
| <i>Solução Nutriente para umidificação Biomassa (hora)</i>  | 3,04      | t/h      |
|                                                             | 3,04      | m³/h     |

**Planta produtora de enzimas celulolíticas - Biomassa umidificada**

| Descrição                                  | Valor       | Unidade  |
|--------------------------------------------|-------------|----------|
| <i>BM umidificada para cultivo (safra)</i> | 27051,88571 | t/safra  |
|                                            | 97733,66133 | m³/safra |
| <i>BM umidificada para cultivo (dia)</i>   | 132,6072829 | t/dia    |
|                                            | 479,0865751 | m³/dia   |
| <i>BM umidificada para cultivo (hora)</i>  | 5,525303455 | t/h      |
|                                            | 19,96194063 | m³/h     |

**Planta produtora de enzimas celulolíticas - Agitação**

| Descrição                                            | Valor      | Unidade  |
|------------------------------------------------------|------------|----------|
| <i>Água para extração (safra)</i>                    | 67.629,71  | t/safra  |
|                                                      | 67.833,21  | m³/safra |
| <i>Água para extração (dia)</i>                      | 331,52     | t/dia    |
|                                                      | 332,52     | m³/dia   |
| <i>Água para extração (hora)</i>                     | 13,81      | t/h      |
|                                                      | 13,85      | m³/h     |
| <i>Biomassa cultivada + água de extração (safra)</i> | 94.681,60  | t/safra  |
|                                                      | 165.566,88 | m³/safra |
| <i>Biomassa cultivada + água de extração (dia)</i>   | 464,13     | t/dia    |
|                                                      | 811,60     | m³/dia   |
| <i>Biomassa cultivada + água de extração (hora)</i>  | 19,34      | t/h      |
|                                                      | 33,82      | m³/h     |
| <i>Atividade por volume de extrato</i>               | 1,25       | FPU/mL   |

**Planta produtora de enzimas celulolíticas - Filtração**

| Descrição                                         | Valor      | Unidade  |
|---------------------------------------------------|------------|----------|
| <i>Eficiência da filtração</i>                    | 98,50      | %        |
| <i>Umidade da BM filtrada</i>                     | 70,00      | %, b.u.  |
| <i>Água de lavagem (safra)</i>                    | 111.664,00 | t/safra  |
|                                                   | 112.000,00 | m³/safra |
| <i>Água de lavagem (dia)</i>                      | 547,37     | t/dia    |
|                                                   | 549,02     | m³/dia   |
| <i>Água de lavagem (hora)</i>                     | 22,81      | t/h      |
|                                                   | 22,88      | m³/h     |
| <i>Água para umidade para BM filtrada (safra)</i> | 10.538,96  | t/safra  |
|                                                   | 10.570,68  | m³/safra |
| <i>Água para umidade para BM filtrada (dia)</i>   | 51,66      | t/dia    |
|                                                   | 51,82      | m³/dia   |
| <i>Água para umidade para BM filtrada (hora)</i>  | 2,15       | t/h      |
|                                                   | 2,16       | m³/h     |
| <i>BM filtrada umidade torta (safra)</i>          | 22.543,24  | t/safra  |
| <i>BM filtrada umidade torta (dia)</i>            | 110,51     | t/dia    |
| <i>BM filtrada umidade torta (hora)</i>           | 4,60       | t/h      |
| <i>Água transferida para extrato (safra)</i>      | 4.508,65   | t/safra  |
|                                                   | 4.522,21   | m³/safra |
| <i>Água transferida para extrato (dia)</i>        | 22,10      | t/dia    |
|                                                   | 22,17      | m³/dia   |
| <i>Água transferida para extrato (hora)</i>       | 0,92       | t/h      |
|                                                   | 0,92       | m³/h     |
| <i>Extrato enzimático (safra)</i>                 | 183.802,36 | t/safra  |
|                                                   | 184.355,43 | m³/safra |
| <i>Extrato enzimático (dia)</i>                   | 900,99     | t/dia    |
|                                                   | 903,70     | m³/dia   |
| <i>Extrato enzimático (hora)</i>                  | 37,54      | t/h      |
|                                                   | 37,65      | m³/h     |

#### **Planta produtora de enzimas celulolíticas - Produtividade**

| Descrição                                       | Valor    | Unidade   |
|-------------------------------------------------|----------|-----------|
| <i>Atividade enzimática da planta por safra</i> | 8,45E+10 | FPU/safra |
|                                                 | 4,59E+05 | FPU/m³    |
| <i>Atividade enzimática da planta por dia</i>   | 4,14E+08 | FPU/dia   |
|                                                 | 4,59E+05 | FPU/m³    |
| <i>Atividade enzimática da planta por hora</i>  | 1,73E+07 | FPU/h     |
|                                                 | 4,59E+05 | FPU/m³    |

**Hidrólise enzimática**

| Descrição                                            | Valor        | Unidade         |
|------------------------------------------------------|--------------|-----------------|
| Volume de extrato por peso de bagaço tratado         | 25,00        | mL/g            |
|                                                      |              | L/kg            |
|                                                      | 25.000,00    | L/ t            |
| Toneladas de bagaço tratado para hidrólise por dia   | 36,15        | t/dia           |
| Toneladas de bagaço tratado para hidrólise por safra | 7.374,22     | t/safra         |
| Glicose liberada por dia                             | 1.868.857,97 | g ART/ dia      |
| Etanol produzido por dia                             | 1.214,76     | L etanol/ dia   |
|                                                      | 247.810,57   | L etanol/ safra |
| Bagaço disponível para hidrólise                     | 73.731,84    | t/safra         |
| Fração do bagaço disponível para hidrólise           | 10,00        | %               |