



Ângelo Alexandre Silva Feliciano

Bioconversão integrada de lamas celulósicas em etanol: alterações processuais para o aumento da produtividade

Coimbra 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Ângelo Alexandre Silva Feliciano

Bioconversão integrada de lamas celulósicas em etanol: alterações processuais para o aumento da produtividade

Dissertação na área científica da Engenharia Química submetida ao Departamento de Engenharia Química, Faculdade de Ciência e Tecnologia, Universidade de Coimbra e inserida no projeto "Energy and Mobility for Sustainable Regions - EMSURE (CENTRO-07-0224-FEDER-002004)"

Supervisor:

Prof. Dr. Jorge Manuel dos Santos Rocha

Instituições:

CIEPQPF - Centro de Investigação em Engenharia dos Processos Químicos e dos Produtos da Floresta, DEQ/FCTUC - Portugal

DEQ/FCTUC - Departamento de Engenharia Química, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra - Portugal

Coimbra
2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

AGRADECIMENTOS

Para a realização desta dissertação de Mestrado contei com apoios e incentivos que sem os quais não teria sido possível tudo isto.

Ao professor Doutor Jorge Rocha orientador da dissertação, agradeço o apoio e a partilha dos seus saberes e as contribuições dadas para este trabalho e pela sua disponibilidade em solucionar as dúvidas que iam existindo.

À professora Doutora Maria Graça Carvalho, agradeço a sua disponibilidade e ajuda em solucionar as dúvidas colocadas.

À professora Doutora Maria da Graça Rasteiro, agradeço a disponibilidade do reómetro e do agitador.

Aos professores que fui tendo ao longo do curso também quero agradecer por tudo aquilo que me transmitiram, pois foram um marco importante para a minha formação.

Cátia Mendes, a tua ajuda, sabedoria e amizade foram muito importantes para a realização deste trabalho, obrigado por tudo.

A todos os funcionários, em especial aos funcionários da oficina, que de forma direta ou indireta também me ajudaram.

Não poderei deixar de agradecer aos meus pais por tudo o que me proporcionaram ao longo desta caminhada e pelo facto de sempre me terem apoiado. Obrigada pelo vosso amor e dedicação.

A minha querida irmã Bruna, que sempre me apoiou e esteve do meu lado.

A toda a minha família pelo apoio e incentivo.

A todos os meus amigos de infância que sempre estiveram comigo, obrigado por todos os momentos partilhados.

Também agradeço aos amigos que fiz em Coimbra pois fazem parte desta jornada.

Não poderei deixar de agradecer ao Gonçalo por toda a amizade que construímos ao longo destes anos, um muito obrigado.

Por último mas não menos importante quero agradecer á Inês, não me vou alongar nas palavras pois sabes o quão importante és para mim.

RESUMO

Nas últimas décadas, a temperatura média global tem vindo a crescer devido à alteração da composição atmosférica resultante da queima dos combustíveis fósseis. De forma a reduzir a poluição ambiental e o consumo de petróleo, têm sido estudado diversos combustíveis alternativos, como o bioetanol. O bioetanol consiste no biocombustível mais utilizado no sector dos transportes, sendo a sua produção a partir de resíduos lenho-celulósicos uma das mais promissoras devido à sua abundância e baixo custo. No presente trabalho foram utilizados resíduos da indústria da pasta e papel como matéria-prima para a produção de bioetanol, tirando partido da fracção de hidratos de carbono (HC). Foram realizados diversos ensaios em que se estudou a possibilidade de aumentar a concentração de etanol obtida através do aumento da consistência da mistura reaccional. Os ensaios realizados de hidrólise e fermentação em simultâneo (SSF), utilizando a *S. cerevisiae* ATCC 26622 e o extrato enzimático NS 22192 (15 FPU/g_{HC}), permitiram atingir uma concentração máxima de etanol de 52 g/L (partindo de 126,5 g/L de HC com 15,6% consistência) e 70,5 g/L (partindo de 174,5 g/L de HC com 28,2% consistência) para as lamas primárias das Fábrica 1 e 2, respetivamente. Posteriormente, realizaram-se ensaios em que se estudou o aumento de escala, desde um balão de erlenmeyer de 250 mL até um bioreator agitado de 5 L, utilizando como critérios de *scale-up* o número de Reynolds constante ou a velocidade periférica do agitador constante. Dentro dos ensaios SSF com as lamas primárias da Fábrica 2, usando uma consistência de 22% e 136,4 g/L de HC, obteve-se uma concentração máxima de etanol de 59,1 g/L e 54,5 g/L para o balão de erlenmeyer e o bioreator de 5L (com um volume útil de 2,5 L), respetivamente. Os objetivos inicialmente propostos foram bem-sucedidos, tendo sido possível tanto o aumento da concentração de etanol como o aumento de escala.

ABSTRACT

Over the last few decades the average global temperature has been increasing due to the change in atmospheric composition resulting from the burning of fossil fuels. In order to reduce environmental pollution and oil consumption they have been studied various alternative fuels, such as bioethanol. Bioethanol is the most widely used biofuel in the transport sector and its production from lignocellulosic waste is one of the most promising because of the abundance and low cost. In this paper we used waste from the pulp and paper industry as raw material for bioethanol production to take advantage from the fraction of carbohydrates (HC). Various experiments were performed in order to increase the ethanol concentration with the increase of the consistency on the reaction mixture. Experiments in simultaneous saccharification and fermentation (SSF) using the *S. cerevisiae* ATCC 26622 and NS 22192 enzymatic extract (15 FPU/g_{HC}), allowed the ethanol concentration reach a maximum level of 52 g / L (starting from 126,5 g / L of HC with 15,6% consistency) and 70,5 g / L (starting from 174,5 g / L HC with 28,2% consistency) for primary sludge from pulp and paper plants 1 and 2, respectively. Subsequently, during the step-wise scale-up process from 250 mL erlenmeyer flask to 5 L stirred bioreactor, the constant Reynolds number and the constant impeller tip speed were evaluated as scale-up methodologies. In the scale-up experiences with primary sludge from the factory 2 using a consistency of 22% and 136,4 g / L HC, it was determined a maximum ethanol concentration of 59,1 g / L and 54,5 g / L for erlenmeyer flask and 5 L bioreactor (with a working volume 2,5 L), respectively. The initially proposed objectives were achievement, it was possible to increase the ethanol concentration and the scale-up was successfully accomplished.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	3
RESUMO	5
ABSTRACT	7
ÍNDICE DE FIGURAS	11
ÍNDICE DE TABELAS	13
SIMBOLOGIAS E ABREVIATURAS	15
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. Geometria/Configuração dos reatores biológicos	4
2.1.1. Tanque agitado	5
2.1.2. Leito Fixo	8
2.1.3. Leito fluidizado	9
2.1.4. Coluna de bolhas (<i>Bubble Columns</i>)	10
2.1.5. Reatores de circulação por arejamento (<i>Air-Lift</i>)	12
2.2. Modos de Operação	14
2.2.1. Operação descontínua	14
2.2.2. Operação Contínua	15
2.2.3. Operação com alimentação escalonada	17
2.3. Aumento de escala (<i>Scale-up</i>)	18
2.4. Reologia	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1. Matéria-prima lenho-celulósica	24
3.2. Extrato enzimático	25
3.3. Microrganismos utilizados na fermentação etanólica	26
3.4. Suspensão de inóculo	26

3.5.	Procedimento SSF	27
3.5.1.	Ensaio em balão de Erlenmeyer	27
3.5.2.	Aumento de escala	30
3.6.	Métodos analíticos	32
3.6.1.	Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)	32
3.6.2.	Determinação dos açúcares redutores através do método DNS modificado	32
3.6.3.	Método de Bradford	33
3.7.	Reómetro	33
3.8.	Parâmetros de <i>Scale-up</i>	34
3.9.	Parâmetros de fermentação	35
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1.	Procedimento SSF	37
4.1.1.	Ensaio em Erlenmeyer	37
4.2.	Reologia	47
4.3.	Aumento de escala	50
5.	CONCLUSÕES E SUGESTÕES DE TRABALHO FUTURO	65
6.	REFERÊNCIAS	67
	Anexos	71
	Anexo I – Determinação da composição química dos materiais lenho-celulósicos	73
	Anexo II – Caracterização do extrato enzimático	77
	Anexo III – Quantidades utilizadas nos ensaios de Erlenmeyer	79
	Anexo IV – Quantificação de compostos por HPLC e respectivos tempos de retenção	81
	Anexo V – Concentração de subprodutos	83
	Anexo VI – Reologia	85
	Anexo VII – Valores fornecidos pelo reómetro para a viscosidade aparente em função da velocidade de corte	87
	Anexo VIII – Quantidades utilizadas nos ensaios de <i>scale-up</i>	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Configuração padrão de um reator agitado (Fonte: Portal laboratórios virtuais de processos químicos).....	5
Figura 2: Leito fixo (Fonte: [21]).....	9
Figura 3: Leito fluidizado (Fonte: [21]).....	10
Figura 4: Representação de uma coluna de bolhas (Fonte: [29]).....	12
Figura 5: a) Reator airlift com circulação interna de tubos concêntricos; b) Reator airlift com circulação externa (Fonte: [33]).	13
Figura 6: a) Geometrias de agitação utilizadas no processo SSF. Legendas: i) hélice grande de 4 pás; ii) hélice pequena de 4 pás; iii) paddle; iv) veio helicoidal, e v) turbina Rushton. b) Foto do processo SSF utilizando um vaso reacional com volume de 1,1 L (VP).	30
Figura 7: Evolução da concentração de a) etanol e b) açúcares redutores para os ensaios A, B e C utilizando uma consistência de 6,2%,11,9% e 15,9%, respectivamente, usando a lama primária da Fábrica 1, em regime descontínuo.....	37
Figura 8: Evolução da concentração de a) etanol e b) açúcares redutores para os ensaios A, B, C e D utilizando uma consistência de 8,1%, 15,8%, 28,2% e 22%, respectivamente, usando a lama primária da Fábrica 2, em regime descontínuo.....	39
Figura 9: Evolução da concentração de a) etanol e b) açúcares redutores para os ensaios C.A e C.B utilizando um tempo de pré-hidrólise de 0,5 e 1 h, respectivamente, usando a lama primária da Fábrica 1.	41
Figura 10: Evolução da concentração de a) etanol e b) açúcares redutores para os ensaios C.E e C.G utilizando um tempo de pré-hidrólise de 6 e 24 h, respectivamente, usando a lama primária da Fábrica 2.	42
Figura 11: Evolução da concentração de a) etanol e b) açúcares redutores para os ensaios C.I, C.II, C.III e C.IV utilizando como percentagem de inóculo 10%,14%,17,5% e 19,6%, respectivamente, usando a lama primária da Fábrica 2.....	44
Figura 12: Evolução da concentração de a) etanol e b) açúcares redutores para os ensaios CV, CVI e CVII utilizando como carga enzimática 15,10 e 5 FPU/g _{H_C} , respectivamente, usando a lama primária da Fábrica 2.	46
Figura 13: Perfil da tensão de cisalhamento em função da velocidade de corte para o ensaio D das LP2.	49
Figura 14: Metodologia de cálculo da γ_{eff} para o balão de Erlenmeyer.	52

Figura 15: Metodologia de cálculo das rpm para o vaso reacional pequeno.....	54
Figura 16: Mistura reacional a) no início do processo SSF e b) após liquefazer.	55
Figura 17: Evolução da concentração de etanol e açúcares redutores no processo SSF para a) ensaio D - balão de Erlenmeyer, b) VP, c) VG, d) biostato, usando a lama primária da Fábrica 2 com uma consistência de 22%.	56
Figura 18: Evolução da concentração de etanol para os ensaios D-Erlenmeyer (velocidade orbital 150 rpm), VP (234 rpm), VG (127 rpm) e Biostato (216 rpm) usando a LP2 com uma consistência 22%.....	57
Figura 19: Evolução da concentração de etanol e de açúcares redutores das amostras a) VP _v 234/100 rpm e b) VG _v 200/127 rpm.	60
Figura 20: Evolução da concentração de etanol e de açúcares redutores da amostra VG _A com uma velocidade de agitação de 200 rpm.	61
Figura 21: Evolução da concentração de etanol e de açúcares redutores das amostras a) VP _p 234 rpm com Paddle e b) RA 200 rpm com a vareta helicoidal.	63
Figura 22: Perfil da viscosidade aparente em função da velocidade de corte para o ensaio D das LP2.....	85

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Composição percentual média (X) e respetivo desvio padrão (σ) para os diferentes tipos de lamas primárias.	25
Tabela 2: Atividade enzimática do extrato enzimático NS 22192 a duas temperaturas.	25
Tabela 3: Quantidade de proteína e de açúcares redutores na enzima usada.	26
Tabela 4: Composição do meio líquido ou sólido para leveduras.	27
Tabela 5: Ensaio de SSF efetuados para o estudo da influência da minimização de tampão e aumento da consistência.	28
Tabela 6: Ensaio de Semi-SSF, efectuados para o estudo da influência da aplicação de uma pré-hidrólise.	29
Tabela 7: Ensaio efectuados para o estudo da influência da percentagem de inóculo de <i>S.cerevisiae</i> ATCC 26602.	29
Tabela 8: Ensaio de SSF efectuados para o estudo da minimização da carga enzimática.	29
Tabela 9: Condições utilizadas em cada ensaio no estudo do aumento de escala. Legenda: VP _p – Vaso reacional pequeno (1,1L) utilizando como agitação uma <i>paddle</i> ; VP _v – Vaso reacional pequeno (1,1L) variando a velocidade de agitação; VG _A – vaso reacional grande (3,4L) em que se aumentou a velocidade de agitação; VG _v – Vaso reacional grande (3,4L) variando a velocidade de agitação.	31
Tabela 10: Dimensões e configurações dos biorreatores. Legenda: V _L – volume de trabalho; D _t – diâmetro interno do recipiente; D _i – Diâmetro da cabeça de agitação; H _l – altura do líquido; H _i – distancia entre o agitador e o fundo do recipiente; H _{i-i} – distancia entre os agitadores.	31
Tabela 11: Equações matemáticas utilizadas no aumento de escala.	34
Tabela 12: Resultados obtidos nos ensaios de SSF das lamas primárias da Fábrica 1 (LP1) e da Fábrica 2 (LP2).	40
Tabela 13: Resultados obtidos nos ensaios de semi-SSF das lamas primárias da Fábrica 1 e da Fábrica 2 (*) tempo decorrido desde a pré-hidrólise, usado para determinar a produtividade.	43
Tabela 14: Resultados obtidos nos ensaios de SSF das lamas primárias da Fábrica 2 (LP2).	45
Tabela 15: Resultados obtidos nos ensaios de SSF das lamas primárias da Fábrica 2.	46
Tabela 16: Representação dos parâmetros obtidos para cada amostra.	50
Tabela 17: Parâmetros obtidos para ambas as amostras no balão de Erlenmeyer.	52
Tabela 18: Parâmetros obtidos para ambas as amostras para o reator de VP 1,1 L.	54

Tabela 19: Resumo do comportamento reológico da mistura e parâmetros hidrodinâmicos para o balão de Erlenmeyer e para os reatores agitados, tendo como base a amostra D.17.	55
Tabela 20: Resumo dos resultados obtidos nos ensaios de SSF das lamas primárias da Fábrica 2 (LP2) no aumento de escala.	58
Tabela 21: Resumo dos resultados obtidos nos ensaios de SSF das lamas primárias da Fábrica 2 (LP2) para os ensaios VP e VG em que se variou a velocidade de agitação ao longo do processo.	62
Tabela 22: Resumo dos resultados obtidos nos ensaios de SSF das lamas primárias da Fábrica 2 (LP2) para os ensaios VP e RA em que se variou a geometria de agitação.	63
Tabela 23: Representação das quantidades utilizadas em cada ensaio, assim como a concentração de hidratos de carbono (g/L) para cada ensaio.	79
Tabela 24: Tempo de retenção, declive da reta e o respetivo fator de correlação para os compostos analisados por HPLC.	81
Tabela 25: Valores obtidos para o ensaio A da LP1, retirado do HPLC.	83
Tabela 26: Valores fornecidos pelo reómetro para a viscosidade aparente em função da velocidade de corte para os ensaios D.17, D.41. e D.72.	87
Tabela 27: Representação das quantidades e condições utilizadas em cada ensaio.	93

SIMBOLOGIAS E ABREVIATURAS

- γ_{eff} – Velocidade de corte efetiva para o balão de erlenmeyer (s^{-1})
- η – Viscosidade aparente (Pa.s)
- CaCO₃ – Carbonato de cálcio
- CO₂ – Dióxido de carbono
- D.O. – Densidade ótica
- d_0 – Diâmetro de agitação da incubadora (m)
- d_f – Maior diâmetro interno do balão de erlenmeyer (m)
- D_i – Diâmetro do agitador (m)
- DNS – Ácido 3,5 – dinitrosalicílico
- D_t – Diâmetro interno do reator (m)
- ETAR – Estação de Tratamento de Águas Residuais
- FPU – Unidade de papel de filtro
- F_r – Número de Froude (adimensional)
- HC – Hidratos de carbono
- HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência
- k – Constante de Metzner e Otto (adimensional)
- K – índice de consistência (Pa.s^m)
- L – fator proporcional (adimensional)
- L – Litro
- m – índice de comportamento do fluido (adimensional)
- mL – Mililitro
- n – Velocidade de agitação da incubadora (rps)
- N_p – Número de potência modificado para o balão de erlenmeyer *unbaffled* (adimensional)
- N_i – Velocidade de agitação do agitador (rps)
- P – Produtividade de etanol (g/(L.h))
- P_f – Energia (Potência) consumida ao balão de erlenmeyer (W)
- Ph – *Phase number* (adimensional)
- Re_f – Número de Reynolds para o balão de erlenmeyer (adimensional)
- Re_i – Número de Reynolds para o agitador (adimensional)
- rpm – Rotação por minuto

rps – Rotações por segundo
SHF – Hidrólise e fermentação em separado
S-SSF – Sacarificação e fermentação semi-simultâneo
SSF – Sacarificação e fermentação em simultâneo
t – Tempo
 T_q – Torque (N.m)
UV – Ultravioleta
 ν – Viscosidade cinemática do fluido ($m^2.s^{-1}$)
 V_l – Volume do líquido (m^3)
 v_t – Velocidade periférica do agitador ($m.s^{-1}$)
x – expoente do número geométrico (adimensional)
Y – Rendimento em etanol (%)
YM – Meio líquido universal para leveduras
 γ – Velocidade de corte (s^{-1})
 τ – Tensão de cisalhamento (Pa)

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas tem-se testemunhado um aquecimento global devido à elevada emissão de gases de efeito de estufa, sendo o dióxido de carbono (CO₂) um dos compostos que tem contribuído para tal. Os combustíveis fósseis são responsáveis por 90% das emissões de CO₂ (35,3% referentes ao petróleo) [1]. Estima-se que, desde 1973 até 2012, as emissões de CO₂ provenientes destas fontes mais do que duplicaram e passaram de valores de 15633 para 31734 milhões de toneladas, respetivamente [2]. Em 2012 foram consumidos como combustível, em todo o mundo, cerca de 8979 milhões de toneladas equivalentes de petróleo, na qual o petróleo corresponde a uma grande fatia de 40,7%. De todo o petróleo consumido em 2012, uma percentagem de 63,7% foi utilizado no sector dos transportes, enquanto que em 1973 essa percentagem era de apenas 45,4%. Este aumento deve-se ao incremento do número de veículos que circulam na estrada. Isto afeta a estabilidade dos ecossistemas, o aquecimento global e as reservas de petróleo. Têm vindo a ser feitos esforços de forma a desenvolver um combustível alternativo tecnicamente fiável, economicamente competitivo, ambientalmente aceitável e abundante. Vários combustíveis alternativos têm sido propostos tais como bioetanol, biodiesel, metanol, hidrogénio, gás natural, gás de petróleo liquefeito (LPG), eletricidade e combustíveis de origem solar. Os biocombustíveis como bioetanol, biodiesel, biogás e biohidrogénio têm origem biológica através de processos termoquímicos e biológicos [3].

Os biocombustíveis têm como vantagens: i) estão facilmente disponíveis a partir de diversas fontes de biomassa; ii) representam um ciclo de dióxido de carbono fechado, porque após a sua queima, o dióxido de carbono libertado é reciclado de volta pela planta; iii) são “amigos” do ambiente, biodegradáveis e sustentáveis [4]. Os biocombustíveis são classificados de primeira ou segunda geração. Os biocombustíveis de primeira geração são produzidos a partir de produtos agrícolas (tais como: milho, cana de açúcar, etc) e os de segunda geração são produzidos a partir de “biomassa vegetal”, referente a materiais lignocelulósicos. A desvantagem dos produtos de primeira geração é que vão competir com os produtos alimentares o que acaba por encarecer os seus preços. A produção de biocombustíveis no ano de 2013 em todo o mundo foi de 65348 milhares de toneladas equivalentes de petróleo, pela qual o Brasil e os Estados Unidos são os maiores responsáveis. Em relação a Portugal, no ano de 2013 apenas se produziram cerca de 208 milhares de toneladas equivalentes de petróleo, o que corresponde a uma cota de 0,3% do mercado, e teve uma descida de 38,3% em relação ao ano de 2012 [5].

O bioetanol produzido a partir de biomassa lignocelulósica tem vindo a ser estudado como um potencial substituto do combustível fóssil, uma vez que a matéria-prima utilizada é barata e abundante, apesar dos custos de recolha. No entanto, a sua comercialização ainda não é possível devido a alguns obstáculos técnicos, tais como a falta de métodos de pré-tratamento eficientes e devido ao baixo rendimento na produção de etanol a elevadas temperaturas [6,7]. Apesar disso, o etanol produzido a partir de biomassa lignocelulósica pode abrir novas oportunidades de emprego nas zonas rurais e, assim, ter um impacto socioeconómico positivo. A biomassa lignocelulósica é composta por celulose (30-60%), hemicelulose (20-40%), lenhina (15-25%), cinzas e alguns extratáveis. Quando a lenhina tem uma percentagem elevada é necessário recorrer a um pré-tratamento para a remover de forma a tornar a celulose mais acessível à hidrólise [8].

O bioetanol, também conhecido por álcool etílico, é um líquido inflamável, com fórmula molecular C_2H_5OH . Devido ao seu elevado nível de octanas, é geralmente misturado (na forma anidra) com a gasolina em concentrações de 10% bioetanol e 90% gasolina (E10), ou pelas normas Europeias, em concentrações de 5% (EN228). Com estas concentrações não há necessidade de alterar o motor do carro. A maior diferença entre os biocombustíveis e matérias-primas provenientes do petróleo é o seu teor de oxigénio. Os biocombustíveis têm níveis de oxigénio de 10 a 45%, ausente no petróleo, tornando as propriedades químicas dos biocombustíveis muito diferentes. Todos têm níveis muito baixos de enxofre e muitos têm níveis baixos de azoto [3].

Em Portugal uma matéria-prima considerada alternativa à biomassa florestal consiste nos resíduos industriais provenientes das indústrias de pasta e papel. Os resíduos sólidos provenientes do processo Kraft são obtidos no clarificador primário na ETAR da própria fábrica e denominam-se por “lamas primárias”. As lamas primárias são ricas em hidratos de carbono e têm um baixo teor de lenhina comparativamente com os substratos lenho-celulósicos naturais. A sua utilização como matéria-prima tem como benefício económico o custo de aquisição ser essencialmente zero, ou até negativo, uma vez que existem custos associados à gestão ambiental deste resíduo. Um outro aspeto positivo é a possibilidade de eliminação do pré-tratamento. O pré-tratamento tem como objetivo alterar ou remover impedimentos estruturais ou composicionais à hidrólise, ao quebrar a estrutura da lenhina e desfazer a estrutura cristalina da celulose, de modo a melhorar o rendimento de produção de açúcares fermentáveis a partir da celulose e da hemicelulose. O pré-tratamento tem sido considerada como uma das etapas de processamento mais caras na conversão da biomassa lignocelulósica, a qual corresponde a 30% do custo total de produção do etanol [9].

A obtenção de etanol envolve processos de elevada complexidade, que englobam diversas estratégias de hidrólise e fermentação. As principais estratégias são a hidrólise e fermentação em separado (*Separated Hydrolysis and Fermentation – SHF*) e a sacarificação e fermentação em simultâneo (*Simultaneous Saccharification and Fermentation – SSF*). A estratégia SHF separa a hidrólise da fermentação, ou seja, depois da biomassa ser hidrolisada em açúcares fermentáveis, estes são encaminhados para um novo reator onde ocorre a fermentação. No processo SSF, a hidrólise e a fermentação dão-se no mesmo reator em simultâneo. As vantagens do processo SHF é que permite que cada processo seja realizado em condições ótimas, ou seja, a hidrólise ocorre a temperaturas perto dos 50°C, enquanto que a fermentação opera em geral a 38°C. O processo SSF tem de operar a uma temperatura compatível, o que se desvia da temperatura ideal de cada processo. A sua principal vantagem comparativamente com o SHF é que os açúcares são consumidos imediatamente pelos microrganismos o que leva a baixas concentrações de açúcar e assim a inibição da enzima é menor. Uma outra estratégia usada na produção de etanol é a sacarificação e fermentação semi-simultânea (S-SSF), que permite conjugar as vantagens do SSF e SHF. Neste caso, as reações de sacarificação e fermentação ocorrem no mesmo reator, mas existe previamente uma fase de pré-hidrólise, que opera em condições ótimas. Dadas estas vantagens, é expectável que no S-SSF a concentração de etanol e o seu rendimento sejam superiores [3, 6, 10]. A concentração de substrato não pode ser muito elevada no S-SSF. No presente trabalho apenas se estudou o SSF e o S-SSF.

O presente trabalho inseriu-se no âmbito da disciplina de Dissertação do Mestrado Integrado em Engenharia Química, ministrado no Departamento de Engenharia Química da Universidade de Coimbra. Deu continuidade a dois trabalhos anteriores realizados no mesmo local, que incidiram sobre a sacarificação e fermentação em simultâneo das lamas primárias da indústria papelreira em etanol, sendo que a sua concentração não foi além dos 50 g/L. No presente trabalho pretendeu estudar-se a continuação desse processo, inserindo alterações processuais para o aumento da eficiência do mesmo, entre as quais o estudo da utilização de uma pré-hidrólise. Além disso, foi iniciado o estudo do aumento de escala nas condições mais favoráveis ao processo de obtenção de etanol a partir das lamas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Geometria/Configuração dos reatores biológicos

Os biorreatores, ou reatores biológicos, são unidades processuais onde ocorre uma reação biológica de crescimento celular (sequência de reações químicas catalisadas por biocatalisadores) sob condições anaeróbias ou aeróbias. Geralmente os biorreatores são trifásicos, consistem em três fases distintas: sólida, líquida e gasosa. A fase sólida corresponde normalmente à biomassa usada como matéria-prima, às células ou até aos suportes de imobilização quando existem: a fase líquida é normalmente constituída por água e alguns nutrientes e a fase gasosa na qual geralmente existe uma corrente de ar a entrar no reator composto por O_2 e N_2 e é libertado CO_2 . Os biorreatores consistem num recipiente no qual um organismo é cultivado de forma controlada com o intuito de obter biomassa microbiana ou algum produto metabolito. O crescimento destes organismos pode ocorrer num meio líquido ou numa superfície sólida. Em culturas submersas as células podem estar suspensas ou imobilizadas. A dimensão dos reatores pode variar de uma escala laboratorial, onde estes processos se realizam em balões de *erlenmeyer* tendo dimensões inferiores a 1L, até a uma escala industrial, onde os volumes podem ultrapassar os 1000 m³ [11, 12]. A escolha da geometria é um aspeto muito importante, pois depende da exigência das células, dos aspetos inerentes de engenharia assim como de considerações económicas. De modo a maximizar a sua produtividade é necessário definir as melhores condições de operação do reator, tais como, agitação e arejamento de forma a não danificar as células, manter as condições ótimas de temperatura, pH, densidade ótica, concentração de O_2 e CO_2 dissolvido para uma dada estirpe, concentrações baixas de substâncias tóxicas e possibilidade em alguns casos de ter que se trabalhar em assepsia [13].

Os reatores são classificados dependendo da forma como o gás é distribuído, com ou sem agitação mecânica; os reatores mais utilizados são os tanques agitados, leito fixo, leito fluidizado, coluna de bolhas e circulação por arejamento [12].

2.1.1. Tanque agitado

O tanque agitado é um dos reatores mais utilizados em processos industriais e tem como vantagens um baixo investimento e custo de operação. Consiste num tanque cilíndrico vertical, em que à escala industrial a razão entre a altura e o diâmetro tem valores que podem variar entre 1 e 6, uma vez que melhora o tempo de retenção das bolhas do gás e aumenta a capacidade de troca de calor entre o meio e o reator. São geralmente feitos em aço inoxidável ou vidro, no qual as paredes do reator são verticais e a base é hemisférica, de forma a evitar zonas de estagnação. No caso de reatores feitos de vidro a sua temperatura pode ser controlada por dois sistemas diferentes: com ou sem camisa de aquecimento. Num sistema sem camisa, o aquecimento é feito através de uma resistência elétrica imersa na mistura reagente. Num sistema com camisa existe um espaço à volta do reactor por onde circula água, cuja temperatura é controlada externamente, sendo este sistema mais preciso e estável. Por norma, 75% do espaço do reator é preenchido com líquido e os restantes 25% é um espaço livre do biorreator, designa-se por *headspace*, utilizado para a libertação dos gases provenientes do processo. Os arejadores devem ser colocados junto do fundo do reator, no caso de um sistema aeróbio. Agitação e aeração elevadas causam grandes problemas, tais como a formação de espuma, que pode levar à contaminação da cultura. Por vezes existe a necessidade de adicionar uma anti-espuma [13, 14].

Na figura 1 está esquematizada a configuração padrão de um reator agitado, onde as dimensões de cada componente estão relacionadas com a dimensão do reator.

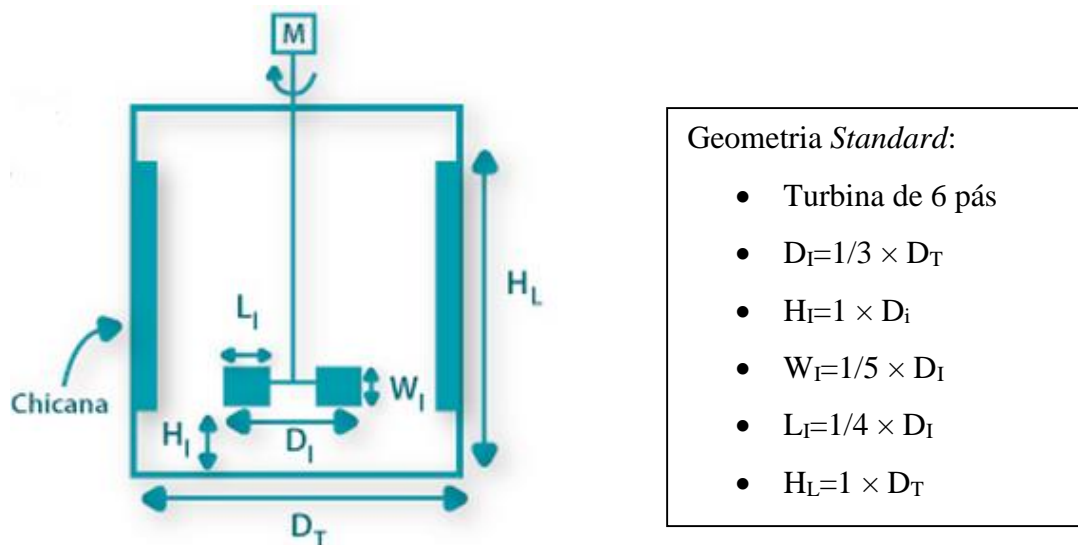


Figura 1: Configuração padrão de um reator agitado (Fonte: Portal laboratórios virtuais de processos químicos).

Um reator agitado pode operar em modo descontínuo, semi-contínuo (alimentação escalonada) ou contínuo. Este tipo de reatores tem como desvantagem uma baixa eficiência de transferência de oxigênio e precisa potências de agitação elevadas, que podem gerar grandes quantidades de calor cuja remoção pode ser um problema. Devido à agitação mecânica geram-se elevadas velocidades de corte que podem danificar a cultura de células mais sensíveis [12].

A homogeneização da suspensão, assim como o auxílio na transferência de calor e massa, é efetuada através de agitação mecânica. A mistura no reator pode ser feita através de agitadores de fluxo laminar ou turbulento. O agitador de fluxo laminar é utilizado para líquidos muito viscosos, e o diâmetro do agitador é semelhante ao diâmetro do reator. Algumas geometrias comuns são o agitador em hélice, o agitador em parafuso e o agitador em âncora. Dentro dos agitadores de fluxo turbulento existe dois tipos distintos: os de escoamento axial e os de escoamento radial. O escoamento radial ocorre quando o fluido se move perpendicularmente ao eixo de rotação, enquanto que no escoamento axial, o fluido move-se para cima ou para baixo ao longo do eixo do agitador. Os agitadores mais utilizados são os *propellers* (tipo hélice marinha), os *paddles* (lâminas) verticais ou inclinados e as turbinas de pás. Os agitadores de tipo hélice marinha são normalmente constituídos por 3 pás fixas ao eixo principal. Geralmente a razão entre o diâmetro da hélice e do reator varia entre 1/5 e 2/3, mas usualmente utiliza-se 1/3. Estes agitadores são de escoamento axial, utilizados em meios pouco viscosos e agitam com velocidades elevadas. Têm como vantagem operar a baixos custos e são mais utilizados em suspensões de sólidos e misturas de líquidos. Um outro agitador axial é o *Propeller* com pás inclinadas, em que o seu ângulo pode variar entre 10° e 90° em relação à horizontal, sendo que o ângulo mais comum é de 45° [13, 15, 16].

Ao contrário dos agitadores axiais, os agitadores radiais são comumente selecionados para baixos níveis de mistura ou tanques alongados. Quando se pretendem misturas mais rigorosas, é necessário aumentar a velocidade de agitação e conseqüentemente há um aumento das velocidades de corte. Estes agitadores empurram o líquido de forma radial contra a parede do vaso reacional, dividindo-se em duas correntes: uma move-se para o topo do tanque e a outra flui para o fundo. Os agitadores de fluxo radial são utilizados principalmente em dispersões líquido-líquido ou gás-líquido. Existem diversos tipos de agitadores radiais que variam em tamanho, forma, curvatura e distância entre as lâminas. Um dos modelos mais comum é a turbina de *Rushton* de 6 pás e pode ser aplicado em processamento de fibras nas indústrias de pasta e papel [15, 16].

Por vezes é necessário utilizar umas chicanas, que consistem em peças metálicas finas e verticais que são montadas contra a parede do tanque, para reduzir o vórtice. Geralmente a

dimensão das chicanas varia entre $D_T / 10$ e $D_T / 12$. Quando os líquidos são pouco viscosos estes estão ligados verticalmente à parede. Para líquidos viscosos a disposição da chicana tem de ser diferente ficando distanciada da parede, ou fixada com um dado ângulo de forma a evitar sedimentação e zonas de estagnação no lado interno [16].

Os agitadores de fluxo axial e radial não são adequados para misturas muito viscosas uma vez que a velocidade de agitação vai diminuindo rapidamente à medida que se afasta da cabeça de agitação, o que leva a uma mistura ineficiente. Para este tipo de mistura é adequado utilizar uma cabeça de agitação com diâmetro próximo do diâmetro do reator, como é o caso de agitadores helicoidais e âncoras. Este tipo de agitação é utilizado para soluções de polímeros, pastas e semi-sólidos. O consumo de energia é superior no fluxo laminar. Além disso, a mistura é realizada com baixas velocidades mas o binário sobre o veio pode ser extremamente alto. Quando a viscosidade do fluido varia durante o processo o mais indicado é variar a velocidade de rotação à medida que a viscosidade se altera, ou seja se a viscosidade aumentar é necessário diminuir a velocidade de rotação. Os agitadores de fluxo laminar fornecem uma mistura macroscópica suave e de baixo cisalhamento. As âncoras são utilizadas para líquidos com viscosidades entre 5000 e 50 000 cP, uma vez que a baixas viscosidades não há arrastamento viscoso suficiente para proporcionar uma mistura eficiente. Estas produzem um fluxo tangencial periférico. Acima de 50 000 cP, especialmente com fluidos não newtonianos, a capacidade de bombeamento dos agitadores em âncora diminui. Com os agitadores helicoidais o líquido movimenta-se de cima para baixo. Os agitadores helicoidais e os de âncora também podem ser utilizados para fluxos turbulentos quando não são necessárias elevadas forças de cisalhamento. Esta é uma vantagem para os processos em que a viscosidade do fluido muda significativamente. Embora os agitadores laminares consigam ter uma mistura eficiente em condições de turbulência, estes não são geralmente recomendados, devido aos seus elevados custos de investimento. Têm normalmente a dimensão de $D_I/D_T = 0,7$ [15].

O tipo de agitador deve ser selecionado consoante as propriedades reológicas do meio e da potência (ou energia) a fornecer [15].

2.1.2. Leito Fixo

O reator de leito fixo (também referido como *packed bed*) consiste num reator tubular, sem agitação mecânica no qual o substrato se move numa dada direção através de um leito contendo células/enzimas imobilizadas numa matriz. Possui um *design* simples e fácil de manusear que permite trabalhar com elevadas densidades e produtividades (10^8 células mL^{-1}). O meio de cultura arrasta consigo os nutrientes necessários até às células e remove os metabolitos tóxicos. O reator pode operar em descontínuo, contínuo ou em semi-contínuo. As matrizes usadas variam no tipo de material, podendo ser de cerâmica, de vidro e de polímeros, tais como poliuretano, poliéster, etc. As matrizes podem variar de tamanho (diâmetro/altura), forma, na porosidade interna, entre outras. Uma matriz ideal é aquela que fornece a combinação necessária da fixação celular, proliferação e produtividade. A matriz deve ser química e biologicamente inerte e não reagir com o produto, de configuração física simples, feita de materiais não-tóxicos, de baixo custo e reutilizável, autoclavável, com elevada área de superfície promover uma difusão ótima a partir da solução para o centro do suporte. As estruturas porosas protegem as células das forças de cisalhamento. Estes reatores são utilizados em culturas de células não animais, tais como o tratamento de águas residuais e biotransformações, através de volumes não superiores a 30L [17, 18].

O principal problema associado a estes reatores é a sua heterogeneidade, causada por gradientes de concentração de nutrientes e produtos residuais. Devido à baixa velocidade de circulação do fluido, as resistências à transferência de calor e massa são elevadas, o que impossibilita a sua aplicação em sistemas de células vivas que requerem uma boa eficiência de transferência de massa gás-líquido [12, 17].

Os reatores de leito fixo são conhecidos como processos de crescimento associado em contraste com os processos de crescimento em suspensão como é o caso do leito fluidizado. Um outro processo de crescimento associado são os filtros de percolação (*trickling filters*), consistem num tanque composto por um enchimento permeável feita de um leito de rocha, escória ou plástico. Utiliza-se para tratar águas residuais na qual a sua matéria orgânica é absorvida pelos microrganismos (aeróbios, anaeróbios, fungos, etc.) que residem no filtro. Os microrganismos que a água residual possui ao fluir sobre o enchimento ligam-se gradualmente á sua superfície. O material orgânico é degradado pelos microrganismos aeróbios na parte externa do suporte [19,20].

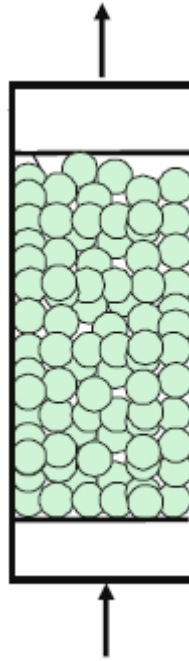


Figura 2: Leito fixo (Fonte: [21]).

2.1.3. Leito fluidizado

Num reator de leito fluidizado pode haver dois tipos de partículas sólidas: células agregadas/floculadas (imobilização natural) e células imobilizadas em suportes sólidos (orgânicos ou inorgânicos, porosos e não porosos) que são mantidas em suspensão através de uma corrente de gás que é fornecido ao reator com o intuito de estabelecer uma mistura gás-sólido-líquido. A corrente de gás pode ser ascendente ou descendente, sendo a ascendente a mais utilizada na qual as partículas sólidas têm uma densidade superior ao líquido. Quanto maior a diferença de densidades entre as partículas sólidas e a fase líquida melhores são as condições de mistura. Os reatores de leito fluidizado são utilizados no sector alimentar, farmacêutico e em tratamento de resíduos biológicos [21, 22]. Em comparação com o leito fixo, este tem a vantagem de apresentar uma boa mistura e melhor interação gás-sólido. A mistura gás-sólido não só aumenta a transferência de massa como aumenta a troca de calor entre a superfície do reator, das partículas e do gás. A queda de pressão ao longo do leito é baixa e não depende da velocidade do gás, o que garante um baixo consumo de energia. As principais desvantagens consistem numa ampla distribuição de tempos de residência do gás devido à dispersão das bolhas e uma ampla distribuição de tempos da residência das partículas sólidas devido à intensa mistura da fase sólida [12]. Um outro problema consiste na dificuldade no *Scale-Up* devido à complexidade da hidrodinâmica. O leito fluidizado também pode ser

mantido com um corrente líquida ascendente (que pode ser recirculada, até para aumentar o rendimento de conversão de substratos ou nutrientes) [22].

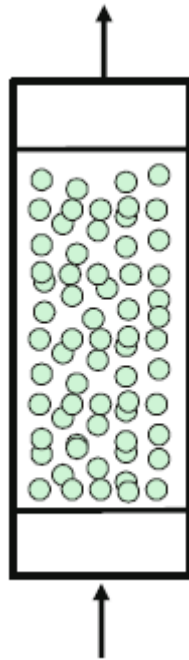


Figura 3: Leito fluidizado (Fonte: [21]).

2.1.4. Coluna de bolhas (*Bubble Columns*)

Uma coluna de bolhas consiste num reator cilíndrico, onde o ar pressurizado é introduzido no fundo da coluna sob a forma de bolhas numa fase líquida ou numa suspensão líquido-sólido, permitindo assim o arejamento e a mistura. As colunas de bolhas são geralmente utilizadas como reatores multifásicos, podem operar em semi-descontínuo (não há adição de meio líquido durante o processo) ou contínuo, e em co-corrente (mesmo sentido) ou em contracorrente (sentidos opostos). Este tipo de reatores são utilizados nas indústrias química, petroquímica, bioquímica e indústrias metalúrgicas. Utilizam-se em processos que envolvam reações químicas de oxidação, cloração, alquilação, de polimerização, e de hidrogenação, podem ainda ser usados em processos de absorção/desabsorção [23, 24]. São utilizadas industrialmente em processos bioquímicos como a produção de fermento de padeiro, cerveja, vinagre e tratamento de águas residuais. As colunas de bolhas industriais possuem normalmente uma razão comprimento/diâmetro de pelo menos 5 e em aplicações bioquímicas, esta varia entre 2 e 5 [25].

Existe a necessidade de compreender as características da hidrodinâmica e da transferência de calor de forma a dimensionar o biorreator. Os perfis de escoamento são

classificados de acordo com a velocidade superficial do gás, havendo dois tipos de escoamento que podem ser frequentemente observados em colunas de bolhas: homogêneo (fluxo borbulhante) e heterogêneo (*churn-turbulent*). O escoamento homogêneo é obtida a uma velocidade superficial de gás baixa, caracteriza-se por ter bolhas de pequenas dimensões e uma velocidade ascendente uniforme. Existe uma distribuição uniforme das bolhas e a mistura é relativamente suave, a quebra e a coalescência da bolha são mínimas. O gás *holdup* aumenta linearmente com o aumento da velocidade superficial do gás.

O escoamento heterogêneo é obtido a uma elevada velocidade superficial do gás elevada, valores superiores a 5 cm/s. O sistema gás-líquido é recirculado de forma turbulenta, tendo como consequência um escoamento instável e bolhas de grandes dimensões, que são formadas por coalescência, com tempos de residência curtos que são formados por coalescência. O coeficiente de transferência de massa gás-líquido é inferior no escoamento heterogêneo comparativamente com o homogêneo. No entanto, apesar deste fato, colunas de bolhas são na sua maioria operadas sob condições de fluxo heterogêneo na indústria química [26, 27].

Um parâmetro essencial no dimensionamento neste tipo de colunas é o gás *holdup*, um valor adimensional que caracteriza os fenómenos de transferência. Define-se como a fração de volume que as bolhas de gás ocupam no reator. O gás *holdup* depende principalmente da velocidade superficial do gás (caudal volumétrico por área da secção transversal da coluna) que é pulverizado no interior da coluna. O gás *holdup* aumenta com a velocidade superficial do gás e com a pressão de operação. As propriedades do líquido têm um impacto na formação das bolhas e/ou na sua coalescência, o aumento da viscosidade do líquido resulta em bolhas de maiores dimensões e conseqüentemente uma maior velocidade de subida das bolhas, e menor gás *holdup*. A adição de um reagente tensioactivo ou surfactante pode aumentar o gás *holdup*. O efeito do tamanho da coluna no gás *holdup* é insignificante quando a razão entre a altura e o diâmetro é superior a 5. Para velocidades baixas de gás, o gás *holdup* apenas depende do número, altura e diâmetro dos orifícios do pulverizador de gás. O tamanho das bolhas e a sua contribuição para o gás *holdup* e para a velocidade de subida tem impactos significativos na hidrodinâmica. O aumento da velocidade superficial do gás, a concentração de sólidos (até um determinado valor) e a viscosidade do líquido tendem a aumentar o tamanho das bolhas. Com a adição de um surfactante, há uma diminuição da tensão superficial o que leva à diminuição do tamanho das bolhas. A transferência de massa é melhorada com bolhas pequenas, pelo que a presença de bolhas de grandes dimensões deve ser evitada nas colunas industriais para transferência de massa efetiva [27].

A utilização de coluna de bolhas tem como vantagens uma operação de baixo custo e pouca manutenção, uma boa transferência de massa e calor sem adição de energia mecânica o que favorece as culturas que são sensíveis às velocidades de corte [16]. Nos casos em que existe uma mistura não newtoniana em fermentações a transferência de massa é deficiente tornando-se numa mistura não uniforme. Têm como desvantagem uma baixa transferência de massa líquido-líquido e líquido-sólido, o que impossibilita a sua utilização em grande escala uma vez que os gradientes de concentração na fase fluida são significativos [28].

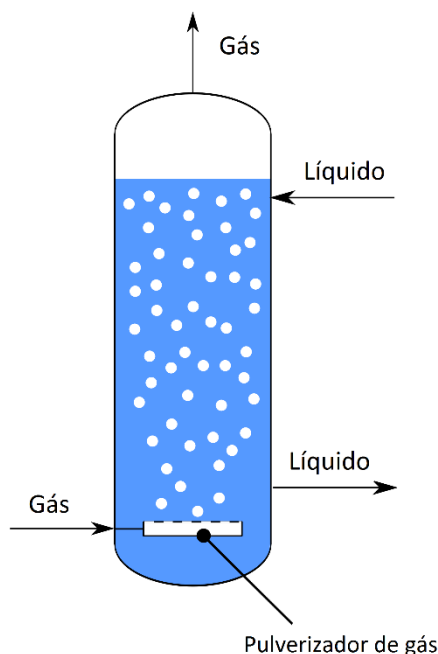


Figura 4: Representação de uma coluna de bolhas (Fonte: [29]).

2.1.5. Reatores de circulação por arejamento (*Air-Lift*)

Os reatores de circulação por arejamento distinguem-se das colunas de bolhas pelo simples facto de que o fluido circula de forma cíclica e bem definida através de canais distintos. A recirculação do líquido ocorre devido a quatro seções distintas: tubo ascendente, tubo descendente, separador do gás e a base. O gás é injetado no fundo da coluna, que ao chegar à zona de separação é libertado e o líquido desce até ao fundo da coluna. A diferença de densidades entre os tubos descendente e ascendente cria uma diferença de pressão que leva à circulação do líquido [30]. Os reatores *air-lift* podem variar entre si na medida em que a circulação pode ser interna ou externa. Quando a circulação é interna as configurações mais utilizadas são de tubos concêntricos ou de corpo dividido. Se for externa, a circulação ocorre através de dois tubos separados na qual apenas o topo e o fundo estão ligados entre si. As

principais variáveis de operação são o caudal de entrada de gás e a distância entre a parte superior do tubo de aspiração e a superfície do líquido. Estas duas variáveis permitem alterar a queda de pressão e o tempo de permanência do gás no reator afetando a velocidade de circulação do líquido. Têm sido desenhados e aplicados em alguns processos específicos, tais como tratamento de águas residuais, produção de proteína microbiana e produção de bioetanol [31].

Apresentam várias vantagens, tais como: eficiência na dispersão do gás, boas características de transferência de calor, mistura rápida, simplicidade de construção e uma baixa probabilidade de perda de esterilidade. Em comparação com as colunas de bolhas, os reatores *air-lift* têm as vantagens adicionais de reatores de circuito fechado, tais como uma maior capacidade de transferência de calor e massa e uma redução no consumo de energia para uma melhor mistura. Os *air-lift* são menos flexíveis a alterações do processo. Além disso, também são limitados na utilização de fluidos de alta viscosidade, porque ocorre uma grande dissipação de energia devido à fricção na parede, o que leva a uma velocidade muito baixa de circulação e a uma mistura ineficiente [30 - 32].

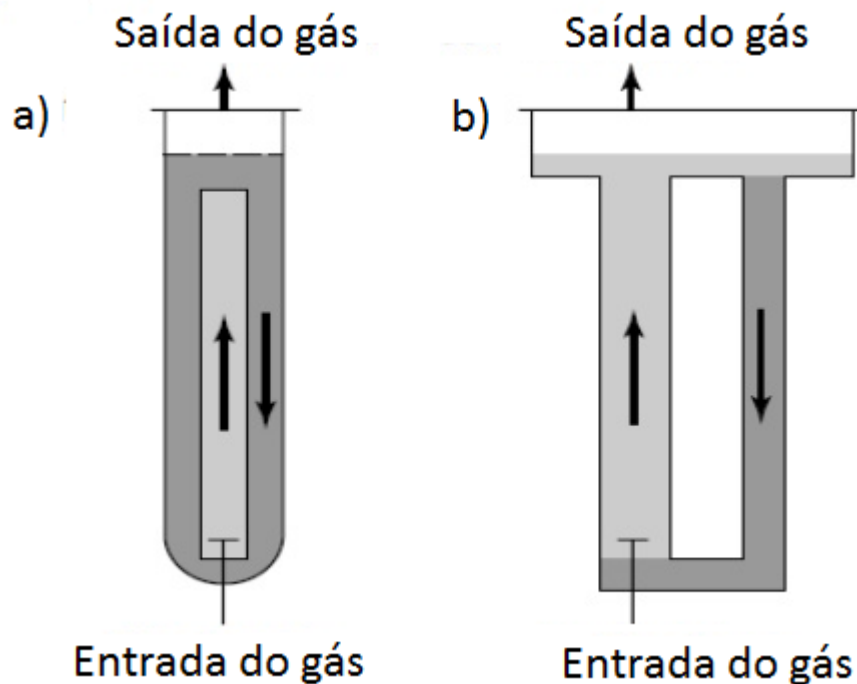


Figura 5: a) Reator *airlift* com circulação interna de tubos concêntricos; b) Reator *airlift* com circulação externa (Fonte: [33]).

2.2. Modos de Operação

Existem três principais modos de operação: descontínuo, contínuo, alimentação escalonada (semi-contínua) [12].

2.2.1. Operação descontínua

A operação descontínua consiste na operação mais simples e que é a mais utilizada em laboratório. Neste tipo de operação os nutrientes necessários à formação do produto são adicionados ao reator no início do processo, nenhum nutriente é adicionado durante operação e os produtos são recolhidos apenas no final. Os controlos básicos para o pH, temperatura, oxigénio dissolvido, e a espuma são aplicados durante o processo. A fermentação termina quando ocorre um ou mais dos seguintes acontecimentos: (i) o crescimento microbiano tenha parado devido ao esgotamento de nutrientes ou à acumulação de compostos tóxicos; (ii) depois de um período pré-definido; (iii) a concentração do produto desejado ter sido alcançada.

Quando as células são cultivadas numa cultura descontínua normalmente passam por quatro fases distintas: fase de adaptação, fase exponencial, fase estacionária e a fase de morte. A fase de adaptação consiste num pequeno crescimento enquanto os microrganismos no início da fermentação se adaptam ao meio. Esta fase deve ser minimizada através da preparação de um inóculo nas mesmas condições da cultura em reator. Quando as células deste inóculo atingem a fase exponencial, o inóculo é transferido para o reator de forma a que os microrganismos não sofram choques ambientais. No final da fase exponencial o esgotamento de nutrientes e a formação de produtos inibidores (tais como etanol, ácido láctico, ácido acético, metanol, e compostos aromáticos) reduzem o crescimento celular e, as células entram numa fase estacionária onde a taxa de crescimento celular é igual à taxa da morte celular. Na fase de morte há uma diminuição do número de células viáveis e ocorre a lise celular [14]. Os produtos associados ao crescimento (metabolitos primários, como por exemplo o etanol) são produzidos durante a fase exponencial e a sua formação diminui na fase estacionária. Os produtos não associados ao crescimento (metabolitos secundários, como por exemplo a maioria dos antibióticos) têm uma taxa insignificante de formação durante o crescimento celular ativo. Estes metabolitos secundários são produzidos quando as células entram na fase estacionária. A fermentação deve ser parada quando a concentração do produto de interesse atinge o valor máximo [34].

Vantagens da operação descontínua [14, 35]:

- Operação simples e de maior fiabilidade, menos suscetíveis a falhas de instrumentação;
- Maior flexibilidade com diferentes sistemas biológicos / produtos;
- Risco reduzido de contaminação;
- Menor investimento de capital quando comparado com processos contínuos para o mesmo volume do biorreator;
- Maior conversão das matérias-primas.

Desvantagens da operação descontínua [14, 35]:

- Acumulação de metabolitos tóxicos que podem restringir o crescimento celular e a formação do produto;
- A concentração inicial do substrato pode ter de ser limitada devido a problemas com a inibição, afetando assim a quantidade de produto que pode ser obtido;
- Variabilidade de lote para lote;
- Tempos mortos entre cada lote devido a limpeza, esterilização, enchimento, etc.

2.2.2. Operação Contínua

Num processo contínuo, uma ou mais correntes são alimentadas continuamente contendo os nutrientes necessários, enquanto que a corrente de efluente constituída por células, produtos e resíduos é removida continuamente de forma a manter um volume constante. O objetivo de um processo contínuo comparativamente com um processo descontínuo é o de manter o ritmo de crescimento de um organismo numa cultura. Isto é possível mantendo condições de estacionaridade (*steady state*), que consiste em manter vários fatores constantes ao longo da fermentação, tais como, o volume de cultura, a biomassa ou o número de células, as concentrações de substrato e produto, bem como os parâmetros físicos do sistema, tais como pH, temperatura e oxigénio dissolvido [36].

Existem várias técnicas de controlo que podem ser utilizadas no processo contínuo. A técnica mais utilizada é o quimiostato, que opera com base na restrição do crescimento da cultura através da disponibilidade limitada de um substrato, enquanto que o turbidostato opera sem qualquer limitação. No quimiostato, a concentração celular é controlada através do fornecimento de um nutriente limitante e através do caudal de entrada. A concentração de substrato e o tempo de retenção no reator pode determinar a densidade celular. Além dos nutrientes e do controlo da taxa de diluição existem diversas variáveis fisiológicas e processuais que afetam a cinética da reação. Em condições de estacionaridade, o crescimento ocorre a uma

taxa específica constante e a concentração de células é maximizada com a taxa de diluição ótima. Há também uma taxa de diluição crítica onde ocorre o fenômeno *wash-out*. No turbidostato, os nutrientes são fornecidos à cultura em excesso. O crescimento não fica dependente do substrato limitante e os microrganismos podem atingir uma taxa específica de crescimento máxima (μ_{\max}). O sistema é controlado através da turvação, uma medida dependente da densidade celular. A densidade celular pode ser medida através de um espectrofotômetro e quando a densidade é superior ao valor do *set-point* o caudal de alimentação é aumentado de forma a diluir a cultura. É accionada a saída de igual caudal de cultura, para manter o volume constante. O turbidostato é utilizado frequentemente na degradação de resíduos tóxicos onde a limitação de nutrientes não é desejável. Tem como vantagens evitar efeitos de *wash-out* e permite produzir células de morfologia e composição uniformes durante períodos prolongados. Tem como desvantagens incrustações na superfície da sonda óptica utilizada para medir a densidade celular e a retenção de algumas bolhas de gás no meio circulante, o que resulta numa medição errada da densidade celular [14].

Vantagens da operação contínua [14, 35]:

- Produtividade e taxa de crescimento podem ser otimizadas alterando o caudal de entrada;
- Períodos mais longos de produtividade com menos tempo de inatividade;
- Os efeitos ambientais ou físicos são facilmente analisados num sistema contínuo, onde a alteração do estado estacionário pode ser facilmente corrigida;
- A evolução de uma dada estirpe pode ser facilmente estudada. Caso o sistema esteja estável em que não há alteração das variáveis, o operador pode selecionar uma dada variável tal como pressão, temperatura, pH, etc., e estudar a resposta da estirpe a essa mudança.

Desvantagens da operação contínua [14, 35]:

- A contaminação pode ser um problema importante e pode resultar no *wash-out* do organismo de interesse e por conseguinte uma perda de produto;
- Pode facilmente ocorrer uma mutação da cultura, podendo o microrganismo perder a sua capacidade de formar o produto desejado;
- Alguns alimentos ou bebidas não podem ser fermentados em processos contínuos uma vez que requerem que alguns produtos celulares sejam adicionados em diferentes fases do procedimento.

2.2.3. Operação com alimentação escalonada

Existem duas variantes neste tipo de alimentação: semi-contínua e semi-descontínua. Numa operação semi-contínua, os caudais de entrada e saída operam de forma intermitente em vez de contínua, por norma o reator opera com um volume fixo em que, a uma dada altura, uma porção do caldo é removida e é repostos um volume igual de meio fresco e nutrientes. Numa operação semi-descontínua o volume varia ao longo do tempo; nada é removido durante o processo mas existe um caudal de entrada com uma alimentação. Este tipo de processo pode ser utilizado para se obter elevados rendimentos ou produtividades uma vez que tende a evitar a inibição por nutriente, ou para maximizar a seletividade de um produto específico em sistemas de reações múltiplas. Em fermentações industriais, este modo de operação é comumente utilizado[36].

Vantagens da alimentação escalonada [14, 36]:

- O controlo da concentração do substrato impede efeitos de inibição, permitindo assim obter densidades celulares mais elevadas;
- A alimentação escalonada permite controlar a taxa de crescimento do microrganismo e consequentemente a procura de oxigénio pode ser facilmente controlada (um aspeto importante em processos aeróbios), o que permite, por exemplo, evitar a produção de etanol quando este não é pretendido;
- A adição de um meio fresco permite a redução da viscosidade da mistura, o que é importante em alguns produtos que são viscosos, tais como polissacáridos. Isto permite um melhor arejamento e agitação da mistura.

Desvantagens da alimentação escalonada [14]:

- É necessário um conhecimento detalhado do crescimento do microrganismo e formação do produto;
- Carência de sensores *online* confiáveis para determinação do substrato necessário em tempo real;
- O operador tem de ser melhor treinado e qualificado.

2.3. Aumento de escala (*Scale-up*)

Por vezes, nem sempre a descoberta de um novo bioproduto, se torna numa inovação tecnológica. Nem sempre é possível tornar essa ideia num negócio rentável, o que impossibilita a sua comercialização. O aumento de escala é uma tarefa importante para os engenheiros químicos e é um passo fundamental na implementação e otimização de processos industriais. Segundo Bision e Kabel, o *scale-up* consiste na viabilidade de uma operação em grande escala, cujo projeto e operação são em parte baseados na experimentação feita a uma escala inferior [14].

Não existe uma receita que nos leve à inovação. É necessário juntar aos conhecimentos técnicos a experiência do operador, consiste num resultado de boas decisões e por vezes de erros. Existem dois aspetos muito importantes a ter em conta no aumento de escala em processos fermentativos: os processos físicos (mistura, transferência de massa, transferência de calor) e os processos metabólicos (cinética microbiana). Os processos físicos são explicados através de modelos matemáticos. Os processos metabólicos não são diretamente dependentes da escala utilizada, no entanto dependem dos fenómenos de transferência, uma vez que o ambiente que envolve uma célula num reator de grandes dimensões não é igual a um reator de menores dimensões.

Existem diversos métodos utilizados para o aumento de escala [37]:

- Métodos fundamentais: Baseiam-se na resolução de equações sobre escoamento combinada com as reações cinéticas. Como a cinética microbiana não é totalmente conhecida, torna teoricamente impossível a resolução destas equações. É necessário fazer pressuposições tanto do modelo cinético como do escoamento.
- Métodos semi-fundamentais: Neste caso aplicam-se modelos simplistas sobre o escoamento juntamente com um modelo cinético adequado. Podem obter-se resultados bastante próximos dos reais.
- Análise adimensional: Baseia-se na comparação dos tempos característicos para cada mecanismo envolvido no processo global de fermentação. Ao analisar os tempos é possível identificar potenciais problemas, tais como limitação do oxigénio.
- *Rule of thumb*: São os métodos mais desejados pelos engenheiros; no entanto, os parâmetros não podem permanecer todos constantes. Seleciona-se apenas um parâmetro.

Um pré-requisito básico para a ampliação de um biorreator é o princípio da semelhança. Existem três tipos de semelhanças: geométrica, cinemática e dinâmica. Em geral, dois objetos

são semelhantes quando têm a mesma forma; portanto, dois biorreatores de tamanhos diferentes são geometricamente semelhantes quando a razão das suas dimensões lineares características são iguais: $H_L/D_T = \text{constante}$; $D_T/D_A = \text{constante}$; em que H_L é a altura do líquido e D_T e D_A são os diâmetros do reator e do agitador respectivamente [12].

A aplicação de regras empíricas para *scale-up* implica que determinados critérios são definidos como ideais em pequena escala e usados em grande escala. Os critérios utilizados em reatores de cultura de células podem ser divididos em dois grupos, aqueles que se centram principalmente na mistura do caldo e na transferência de massa, e aqueles que consideram os danos mecânicos às células [13].

Alguns parâmetros utilizados para o aumento de escala [16, 37]:

- Coeficiente de transferência de massa volumétrica (kLa): A determinação do kLa em biorreatores é essencial a fim de estabelecer a eficiência de aeração e quantificar os efeitos das variáveis operacionais no fornecimento de oxigênio dissolvido. Existem diversos métodos para calcular a velocidade de transferência de oxigênio, que podem ser classificados dependendo se a medição é realizada na ausência de microrganismos ou com células mortas ou na presença de biomassa que consome oxigênio no momento em que a medição está a ser feita. Este parâmetro é mantido constante com a variação de escala e é utilizado preferencialmente em sistemas aeróbios.
- Velocidade periférica do agitador: Ao manter a velocidade periférica do agitador facilmente se controlam as velocidades de corte e certifica-se que as células não sofrem danos mecânicos, que podem ocorrer a velocidades de 3,2 m/s. A velocidade periférica do agitador pode ser calculada através da equação:

$$v_t = \pi * N_i * D_i \quad \text{Equação 1}$$

Em que:

v_t = Velocidade periférica do agitador, m.s^{-1}

N_i = Velocidade de rotação do agitador, rps

D_i = Diâmetro do agitador, m.

- Potência por unidade de volume: É um parâmetro utilizado em diversos estudos de fermentação em que as células são sensíveis às velocidades de corte. A potência fornecida é utilizada tanto na agitação como no arejamento (compressão de ar). Em reatores agitados a potência que predomina é a de agitação, enquanto que para as colunas de bolhas e *air-lifts* a potência dominante é a de compressão. Por norma, a

energia fornecida a um processo aeróbio é superior ao anaeróbio e depende de vários fatores, tais como: velocidade de agitação, diâmetro da cabeça de agitação, massa volúmica do fluido e viscosidade do fluido. O consumo de energia através da agitação pode ser caracterizado através de um número adimensional, número de potência N_p .

$$N_p = \frac{P}{\rho N_i^3 D_i^5} \quad \text{Equação 2}$$

Em que:

N_p = Número de potência, adimensional

P = Consumo de energia, W

ρ = Massa volúmica do fluido, kg.m^{-3}

D_i = diâmetro do agitador, m.

O valor de N_p varia com o Re . Para escoamentos turbulentos o valor de N_p é constante para cada tipo de agitador e não depende do número de Reynolds. Para $Re < 10$ as forças viscosas predominam, pelo que a potência já depende do número de Re . No regime de transição tanto as forças de inércia como as viscosas têm de ser consideradas, e para um dado número de potência pode calcular-se o consumo de energia.

$$P = N_p * \rho * N_i^3 * D_i^5 \quad \text{Equação 3}$$

Esta equação é utilizada apenas para uma cabeça de agitação. Quando se utiliza mais do que uma cabeça de agitação, uma aproximação inicial feita é a de calcular o valor de P para cada agitador e somar todos. A potência pode ser calculada se o torque for conhecido através da equação:

$$P = 2 * \pi * N * T_q \quad \text{Equação 4}$$

Em que:

N_i = Velocidade de rotação do agitador, rps

T_q = Torque, N.m

Sabendo o valor de P pode se calcular N_p .

- Caudal volumétrico de gás por unidade de volume de líquido.
- Velocidade superficial do gás: tanto esta como a anterior referem-se à taxa de arejamento utilizada em fermentações aeróbicas. Ambos prevêm a transferência de oxigénio em biorreatores, mas podem também afetar negativamente as células como consequência das forças de cisalhamento.
- Tempo de mistura: define-se como o tempo necessário para que um líquido ao ser agitado obtenha um determinado grau de homogeneidade, após a adição de um *tracer*. Na literatura existem modelos matemáticos que permitem prever os tempos de mistura para sistemas em que existe apenas uma fase ou duas fases gás-líquido; situações com $Re < 1000$ devem ser evitadas [38]. No trabalho aqui apresentado, o parâmetro do tempo de mistura não pode ser utilizado uma vez que se tem no início uma mistura heterogénea líquido-sólido.
- Número de Reynolds constante: As propriedades hidrodinâmicas do caldo de fermentação devem ser consideradas no aumento de escala principalmente para processos anaeróbios e quando não existe semelhança geométrica entre os diferentes reatores, manter o número de Reynolds é a melhor solução.

Estes três últimos parâmetros baseiam-se na transferência de massa no sistema e como ela se relaciona com as forças de cisalhamento [39].

No aumento de escala, ao manter um parâmetro constante os outros tendem a alterar. Se a velocidade de agitação (rpm) e o tempo de mistura se mantiverem, ocorre um aumento de energia por unidade de volume (P/V). Se a velocidade periférica é mantida constante, o valor da potência por unidade de volume diminui drasticamente e, por conseguinte, a velocidade de transferência de massa do oxigénio também diminui. Se o número de Reynolds se mantiver constante, a potência a fornecer à mistura diminui e consequentemente o tempo de mistura aumenta. Se o número de Reynolds for baixo, então a agitação é baixa e consequentemente, existirão zonas mortas no reator. Normalmente, o número de Reynolds aumenta com o aumento de escala. Ao manter constante a velocidade periférica do agitador, parâmetro muito utilizado na indústria da fermentação, o consumo de energia é muitas vezes reduzido, o que pode afetar adversamente a bioconversão [13, 15].

Em muitos processos, o oxigénio comporta-se como um substrato limitante e o coeficiente de transferência de massa volumétrica de oxigénio deve ser utilizado como parâmetro de aumento de escala. A velocidade de transferência de oxigénio pode ser mantida constante, aumentando a velocidade de agitação que simultaneamente altera o consumo de energia. No entanto, se a mistura reacional for viscosa utiliza-se como parâmetro o tempo de

mistura constante. O tempo de mistura é definido como o tempo necessário para a composição do reator alcançar um determinado nível de homogeneidade e pode ser calculado através da adição de um “tracer”. O tempo de mistura contém informações sobre o escoamento e a mistura do caldo e pode ser útil para o aumento de escala de processos em que o crescimento é controlado [16, 37].

2.4.Reologia

A conversão da biomassa em combustíveis derivados de açúcares envolve diversas reações bioquímicas. Uma conversão eficiente nessas reações exige uma distribuição adequada e uniforme do calor, dos nutrientes e da enzima. Um fator muito importante que afeta a mistura é a reologia (ou a viscosidade) do caldo de fermentação. A reologia descreve a deformação de um fluido sob a influência de uma tensão tangencial e quanto maior a sua viscosidade menor será a sua velocidade de escoamento. A viscosidade é definida como a razão entre a tensão de corte e a velocidade de cisalhamento (ou de corte) para um fluido newtoniano. A tensão de corte consiste na força por unidade de área tangencial necessária para que o fluido comece a escoar. A velocidade de cisalhamento é a velocidade transversal de um fluido no interior das placas paralelas geradas quando a tensão de cisalhamento é aplicada. Para um fluido newtoniano a viscosidade é independente da velocidade de corte γ aplicada ao fluido. Os fluidos não-newtonianos não apresentam um comportamento linear entre a tensão e a velocidade de corte, podendo apenas calcular-se uma viscosidade aparente [37].

Geralmente as lamas têm um comportamento de um fluido não newtoniano. A baixas concentrações (<4%), as partículas num fluido newtoniano formam suspensões na qual as partículas sólidas estão longe umas das outras e as suas interações são desprezáveis. Neste tipo de suspensões diluídas o fluido tem um comportamento newtoniano, isto se as partículas forem esferas isotrópicas. Se as partículas não forem esféricas estas podem ter um comportamento não-newtoniano mesmo para baixas concentrações. À medida que a concentração de sólidos aumenta, existe uma maior interação hidrodinâmica entre as partículas e entre estas e o fluido. Para concentrações elevadas de sólido, quando o volume do líquido é menor que o volume dos espaços vazios entre as partículas, forma-se uma suspensão densa e as interações entre as partículas prevalecem. Um problema comum com as lamas é que estas podem absorver o líquido/água, tornando a mistura insaturada. Quando isto acontece, os espaços entre as partículas contêm ar em vez de líquido e a biomassa comporta-se como um material granulado

Bioconversão integrada de lamas celulósicas em etanol: alterações processuais para o aumento da produtividade

húmido, a mistura torna-se compressível e as partículas facilmente se aglomeram. Assim sendo, como não existe água “livre” dificulta a agitação e a mistura não é eficiente. Nos reatores em que a biomassa é convertida em etanol, normalmente opera-se com velocidades de corte baixas. Como as reações de hidrólise e fermentação são reações bioquímicas lentas não é precisa uma forte agitação para a transferência de massa e calor necessárias [40]. Para baixas velocidades de corte as lamas tendem a ter um comportamento *shear-thinning* (pseudoplasticidade). A pseudoplasticidade é uma propriedade característica dos fluidos não newtonianos no qual a sua viscosidade aparente diminui com o aumento da velocidade de corte. Para elevadas velocidades de corte, as lamas podem exibir um comportamento newtoniano ou *shear-thickening* (dilatante). Num fluido dilatante, a viscosidade aparente aumenta com o aumento da velocidade de corte. A viscosidade pode ainda variar com o tempo de aplicação da velocidade de corte: se diminuir tem nome de tixotropia, se aumentar designa-se por reopexia [40].

Num reator agitado a velocidade de corte não é constante em todo o volume, tendo valores maiores próximo do agitador. Não é possível especificar uma viscosidade para um fluido não newtoniano. No entanto, a velocidade de corte média é dado por $\gamma = kN$, em que N é a velocidade de agitação em rps e k é um valor constante que varia normalmente entre 10 e 13. Para fluidos não newtonianos a tensão (ou força) de cisalhamento exercida (τ) no fluido não é proporcional à velocidade de corte, apenas se podendo calcular a viscosidade aparente [37, 41-43]. No entanto, a viscosidade das lamas é dependente do tempo de processamento.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Matéria-prima lenho-celulósica

A biomassa lenho-celulósica utilizada como matéria-prima foram as lamas primárias geradas e fornecidas por duas fábricas diferentes de pasta e papel, que vão ser referidas como Fábrica 1 e Fábrica 2. As lamas primárias são compostas principalmente por fibras (celulose e hemicelulose), cinzas e lenhina residual.

A caracterização das diferentes matérias-primas lenho-celulósicas foi realizada tendo em conta a determinação dos seguintes parâmetros: teor de hidratos de carbono (constituído por celulose e hemicelulose), sólidos totais (quantidade percentual de sólidos na biomassa), lenhina total (solúvel e insolúvel) e cinzas. A partir das cinzas calculou-se o teor de carbonato de cálcio (CaCO_3). Os hidratos de carbono (HC) foram calculados pela diferença entre a matéria orgânica e a lenhina total, em que a matéria orgânica corresponde à diferença entre os sólidos totais e as cinzas (Anexo I). Os parâmetros acima mencionados foram calculados tendo em conta os seguintes protocolos: LAP-001: “*Standard Method for Determination of Total Solids in Biomass*”, LAP-003: “*Determination of Acid-Insoluble Lignin in Biomass*”, LAP-004: “*Determination of Acid-Soluble Lignin in Biomass*”, e LAP-005: “*Standard Method for Ash in Biomass*”, elaborados pelo Laboratório Nacional de Energia Renovável (National Renewable Energy Laboratory – NREL) (NREL-LAP 001, 1994; NREL-LAP 003, 1995; NREL-LAP 004, 1996; NREL-LAP 005, 1994). Na tabela 1 estão representados os valores médios (\bar{X}) obtidos para os parâmetros acima referidos, assim como o seu desvio padrão (σ) uma vez que foram realizados 3 ensaios para cada lama primária.

Bioconversão integrada de lamas celulósicas em etanol: alterações processuais para o aumento da produtividade

Tabela 1: Composição percentual média (\bar{X}) e respetivo desvio padrão (σ) para os diferentes tipos de lamas primárias.

Matérias-primas	Constituintes	Sólidos Totais (%)		HC	Lenhina Total		Cinzas		CaCO ₃	
		\bar{X}	σ	(% em base seca)	(% em base seca)		(% em base seca)		(% em base seca)	
Lenho-celulósicas										
Lamas primárias da Fábrica 1		22,8	0,2	81,1	2,6	0,5	16,3	1,5	5,7	2,5
Lamas primárias da Fábrica 2		50,3	0,3	62,1	5,4	0,9	32,5	3,5	25,1	7,9

3.2. Extrato enzimático

De forma a hidrolisar os hidratos de carbono em açúcares fermentáveis (glucose e xilose) usou-se o extrato enzimático NS 22192 (na forma de solução aquosa), gentilmente fornecido pela Novozymes. Este extrato é constituído por celulasas, hemicelulasas e β -glucosidasas e a sua actividade é máxima num intervalo de temperatura ótimo entre 45°C e 50°C e em meios com pH 5,0 a 5,5. A atividade enzimática do extrato foi determinada usando o protocolo LAP-006 “*Measurement of Cellulase Activities*”, efetuado pelo NREL (NREL – LAP 006, 1996) (Anexo II). A atividade enzimática foi calculada para uma gama de temperaturas de 38°C (temperatura a que ocorre o SSF) e 50°C, os valores obtidos estão representados na tabela 2.

Tabela 2: Atividade enzimática do extrato enzimático NS 22192 a duas temperaturas.

Enzima	Temperatura	
	38°C (FPU/mL de solução de enzima)	50°C (FPU/mL de solução de enzima)
NS 22192	72,5	185,0

A unidade de FPU (*Filter Paper Unit*) corresponde à velocidade de produção de 2 miligramas de glucose a partir da hidrólise de 50 mg de papel de filtro durante 1 h de reação.

Recorreu-se ao método de Bradford e ao método de DNS modificado para calcular a quantidade de proteína e de açúcares redutores na solução de enzima utilizada, respetivamente. A tabela 3 apresenta os valores obtidos.

Tabela 3: Quantidade de proteína e de açúcares redutores na enzima usada.

Enzima	[Eq. BSA] (g/L)	[Eq. Glucose] (g/L)
NS 22192	73	80

3.3. Microrganismos utilizados na fermentação etanólica

Os microrganismos que têm sido utilizados frequentemente para fermentar os açúcares derivados da biomassa lenho-celulósica são: a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e a bactéria *Zymomonas mobilis*. A *S. cerevisiae* tem sido o microrganismo mais usado, pois consegue facilmente fermentar hexoses (glucose, manose e galactose), mas dificilmente converte a xilose. Para que um microrganismo possa ter aplicação industrial tem de possuir as seguintes características: rendimento em etanol > 90%, concentração de etanol > 40g/L, produtividade > 1g/(L h). Estas indicações foram baseadas na indústria do amido [3].

Nos casos em que o valor da matéria-prima tem um elevado peso no custo de produção (por norma é responsável por 1/3 dos custos), a característica que tem recebido mais atenção é o rendimento em etanol. O objetivo é maximizar o rendimento de forma a utilizar menos matéria-prima [44]. No presente trabalho, uma vez que a matéria-prima utilizada é um resíduo com um custo de aquisição desprezável para a fábrica de pasta e papel, os aspetos a ter em consideração são a concentração de etanol e a produtividade da transformação biológica. De forma a tornar-se um processo economicamente viável, a concentração de etanol formado deve ser superior a 4-5% (v/v) (32-39,5 g/L) [45]. Neste processo de valorização das lamas, a etapa que tem um maior peso no custo final será a destilação, uma vez que terá de ser utilizada uma elevada quantidade de energia para separar a água do etanol.

3.4. Suspensão de inóculo

Ao longo do trabalho, utilizou-se a levedura *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 26602. Antes de cada ensaio de SSF, foi preparado um inóculo fresco de levedura em meio líquido, cuja composição química se encontra na tabela 4. O inóculo fica a incubar cerca de 12 h, a 38°C e a 150 rpm, sendo posteriormente adicionado ao processo SSF em estudo.

Tabela 4: Composição do meio líquido ou sólido para leveduras.

Meio para leveduras	
Composto	Quantidade (g/L)
Extrato de levedura	3
Peptona	5
Glucose	10
Agar*	15
Água destilada	Até perfazer o volume desejado

*Apenas utilizado em meios sólidos

3.5. Procedimento SSF

Os ensaios SSF foram realizados de acordo com o protocolo LAP-008 "SSF Experimental Protocols: Lignocellulosic Biomass Hydrolysis and Fermentation".

3.5.1. Ensaios em balão de Erlenmeyer

Em pequena escala, os ensaios SSF foram realizados em balões de Erlenmeyer de 250 mL. As experiências foram efetuadas em regime descontínuo, nas quais a matéria-prima lenhocelulósica foi adicionada a uma solução de tampão. Portanto, a mistura reacional nos diversos ensaios de SSF era composta pelos seguintes constituintes:

- Lamas primárias;
- Solução de nutrientes: 3 g/L de extrato de levedura e 5 g/L de peptona;
- Solução de inóculo de levedura *S. cerevisiae* ATCC 26602;
- Solução do extrato enzimático NS 22192: carga enzimática de 15 FPU/g_{HC} (por grama de hidrato de carbono adicionada na sua forma polimérica).

Os balões foram tapados com algodão e folha de papel de alumínio de forma a limitar a entrada de oxigênio e posteriormente colocados em incubadoras orbitais a 38°C e 150 rpm. Ao longo do processo, foram retiradas amostras periódicas de 1,5 mL, analisadas através do método de quantificação de açúcares redutores (DNS), de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e medição de pH. Foi estudada a influência de certas variáveis na eficiência do processo de SSF, tais como:

- Efeito da minimização de água (tampão) utilizada na mistura reacional (SSF em estado sólido)

No ensaio A estabeleceu-se um volume de trabalho de 100 mL, o qual continha inicialmente 50 g/L de hidratos de carbono (procedimento seguido em trabalhos anteriores). No ensaio B a solução de tampão não foi adicionada de forma a aumentar a consistência (massa de lamas primárias secas/ massa do líquido total), mantendo-se os restantes constituintes (lamas primárias, solução de inóculo e solução de nutrientes).

Nos ensaios C e D a solução de tampão não foi adicionada e adicionou-se uma quantidade maior de lamas o que levou a um aumento da concentração de hidratos de carbono. As quantidades utilizadas em cada ensaio apresentam-se detalhadamente no anexo III. Os ensaios encontram-se apresentados na tabela 5.

Tabela 5: Ensaio de SSF efetuados para o estudo da influência da minimização de tampão e aumento da consistência.

Lamas Primárias	Ensaio	V _{total} (mL)	Consistência (% p/p)	[HC] _{inicial} (g/L)	Carga enzima (FPU/g _{HC})	%Inóculo (% v/v)
Fábrica 1	A	100	6,2	50	15	10
	B	52	11,9	96	15	19,2
	C	79	15,6	126,5	15	12,7
Fábrica 2	A	100	8,1	50	15	10
	B	51,1	15,8	97,8	15	19,6
	C	57,2	28,2	174,5	15	17,5
	D	57	22	136,6	15	15,6

- Efeito da aplicação de pré-hidrólise (Semi-SSF)

Para o estudo da influência da aplicação de uma pré-hidrólise, usou-se como base os ensaios C apresentados na tabela 5, para cada tipo de lama. O processo Semi-SSF consiste em aplicar uma pré-hidrólise durante um determinado intervalo de tempo, que ocorre a 50°C (temperatura óptima para a actividade enzimática). Decorrido esse intervalo, a temperatura do processo é reduzida para 38°C e junta-se então o inóculo de levedura, continuando a decorrer o processo de hidrólise e iniciando-se o processo de fermentação. Na tabela 6 encontram-se apresentados os ensaios efectuados, nos quais se variou o tempo de pré-hidrólise desde 0,5 a 24 h, antes da inoculação.

Bioconversão integrada de lamas celulósicas em etanol: alterações processuais para o aumento da produtividade

Tabela 6: Ensaios de Semi-SSF, efectuados para o estudo da influência da aplicação de uma pré-hidrólise.

Ensaio	t de pré-hidrólise (h)	V _{total} (mL)	Consistência (% p/p)	[HC] _{inicial} (g/L)	Carga enzima (FPU/g _{HC})	%Inóculo (% v/v)
Lamas Primárias Fábrica 1						
C.A	0,5					
C.B	1					
C.C	2					
C.D	3	79	15,6	126,5	15	12,7
C.E	6					
C.F	18					
C.G	24					
Lamas Primárias Fábrica 2						
C.E	6	57,2	28,2	174,5	15	17,5
C.G	24					

- Efeito da percentagem de inóculo utilizado

Foram estudadas percentagens de 10 (valor utilizado em trabalhos anteriores e recomendado no protocolo LAP-008) a 20% de inóculo em relação ao volume total. A tabela 7 descreve os ensaios efectuados durante este estudo.

Tabela 7: Ensaios efectuados para o estudo da influência da percentagem de inóculo de *S.cerevisiae* ATCC 26602.

Lamas Primárias Fábrica 2	Inóculo (% v/v)	V _{total} (mL)	Consistência (% p/p)	[HC] _{inicial} (g/L)	Carga enzima (FPU/g _{HC})
Ensaio	C.I	10			
	C.II	14			
	C.III	17,5	57,2	28,2	174,5
	C.IV	19,6			15

- Efeito da minimização da carga enzimática

A tabela 8 apresenta os ensaios efectuados para estudar o efeito da minimização da carga enzimática, nos quais se testaram as cargas de 10 e 5 FPU/g_{HC}, além da carga de 15 FPU/g_{HC}, já utilizada anteriormente.

Tabela 8: Ensaios de SSF efectuados para o estudo da minimização da carga enzimática.

Lamas Primárias Fábrica 2	Carga enzima (FPU/g _{HC})	V _{total} (mL)	Consistência (% p/p)	[HC] _{inicial} (g/L)	Inóculo (% v/v)
Ensaio	C.V	15			
	C.VI	10	57,2	28,2	174,5
	C.VII	5			17,5

3.5.2. Aumento de escala

O aumento de escala foi realizado em vasos reacionais, com volumes de 1,1 L (VP – Vaso Pequeno) e 3,4 L (VG – Vaso Grande), num reator de acrílico (RA) de 1,5 L, e no reator automatizado Biostat® B-Plus, da marca Sartorius, (Bi) de 5 L. Os vasos reacionais e o reator de acrílico foram mergulhados num banho de água cuja temperatura foi controlada para que o interior do recipiente estivesse a 38°C. No Biostat® B-Plus o controlo de temperatura é realizado através da camisa exterior onde circula água. Utilizaram-se várias geometrias de agitação, apresentadas na figura 6 a): i) hélice grande de 4 pás; ii) hélice pequena de 4 pás; iii) *paddle*; iv) veio helicoidal, e v) turbina *Rushton*. Na figura 6 b) está esquematizado o processo SSF com a utilização de um vaso reacional de volume 1,1 L.

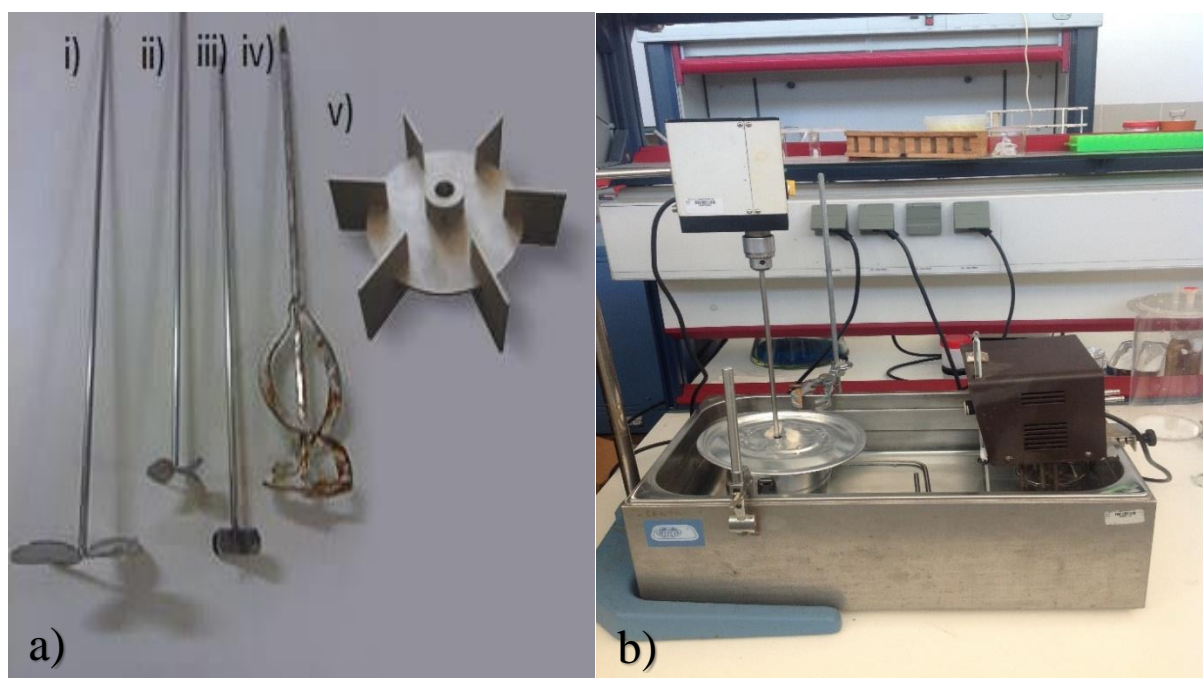


Figura 6: a) Geometrias de agitação utilizadas no processo SSF. Legendas: i) hélice grande de 4 pás; ii) hélice pequena de 4 pás; iii) *paddle*; iv) veio helicoidal, e v) turbina *Rushton*. b) Foto do processo SSF utilizando um vaso reacional com volume de 1,1 L (VP).

Os ensaios de SSF foram realizados em descontínuo e utilizaram-se apenas as lamas primárias da Fábrica 2 para estudar o aumento de escala. Ao longo do processo, foram retiradas amostras periódicas de 2 mL de forma a quantificar os açúcares redutores, analisar no HPLC e medir o pH. Na tabela 9 pode verificar-se as condições utilizadas em cada ensaio. Em todos os ensaios utilizou-se uma carga enzimática de 15 FPU/g_{HC} e uma percentagem de inóculo de 15,5% (v/v).

Bioconversão integrada de lamas celulósicas em etanol: alterações processuais para o aumento da produtividade

Tabela 9: Condições utilizadas em cada ensaio no estudo do aumento de escala. Legenda: VP_p – Vaso reacional pequeno (1,1L) utilizando como agitação uma *paddle*; VP_v – Vaso reacional pequeno (1,1L) variando a velocidade de agitação; VG_A – vaso reacional grande (3,4L) em que se aumentou a velocidade de agitação; VG_v – Vaso reacional grande (3,4L) variando a velocidade de agitação.

Reator	Ensaio	V _{total} (mL)	Consistência (% p/p)	Geometria de Agitação	Velocidade de Agitação (rpm)
Vaso reacional pequeno – 1,1L	VP	476	22	Hélice pequena 4 pás	234
	VP _p	476	22	<i>Paddle</i>	234
	VP _v	476	22	Hélice pequena 4 pás	234/100
Vaso reacional grande – 3,4L	VG	1411	22	Hélice grande 4 pás	127
	VG _A	1411	22	Hélice grande 4 pás	200
	VG _v	1411	22	Hélice grande 4 pás	200/127
Reator Acrílico – 1,5L	RA	1000	22	Veio helicoidal	200
Biostat®B-Plus – 5L	Bi	2500	22	Rushton	216
Erlenmeyer – 250mL	D	57	22	Agitação orbital	150

O aumento de escala foi realizado tendo em conta alguns parâmetros de *scale-up*. Na “replicação” dos ensaios Erlenmeyer para o VP manteve-se constante o número de Reynolds. O *scale-up* dos biorreatores agitados mecanicamente foi realizado tendo em conta a velocidade constante de agitação periférica do agitador. Foram ainda estudados os efeitos da consistência, da geometria e da velocidade de agitação. Os detalhes das dimensões e configurações dos biorreatores estão representados na tabela 10.

Tabela 10: Dimensões e configurações dos biorreatores. Legenda: V_L – volume de trabalho; D_t – diâmetro interno do recipiente; D_i – Diâmetro da cabeça de agitação; H_l – altura do líquido; H_i – distancia entre o agitador e o fundo do recipiente; H_{i-i} – distancia entre os agitadores.

Dimensões e configurações	VP-1,1L	VG-3,4L	RA	Bi-5L
V _L (L)	0,48	1,4	1	2,5
D _t (cm)	10	17	10	10
D _i (cm)	6	11	7,5	6,5
H _l (cm)	6,1	6,2	12,7	31,8
H _i (cm)	1,5	2	1	5
H _{i-i} (cm)	n.a	n.a	n.a	10
D _t /D _i	1,7	1,54	1,3	1,54
H _l /D _i	1	0,6	1,7	4,9

3.6. Métodos analíticos

3.6.1. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

O método de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi utilizado para quantificar a produção de etanol em cada ensaio. Utilizou-se o equipamento Knauer modelo K-301 constituído por uma coluna Hi-Plex Ca 8 μ m, de 300 \times 7,7 mm (Agilent) mantida a 80°C e acoplada ao detetor de índice de refração (Knauer). O eluente utilizado foi água ultrapura degaseificada, bombeada a um caudal de 0,6 mL/min. O etanol foi identificado através do seu tempo de retenção na coluna, sendo a sua concentração determinada através de uma curva de calibração previamente construída. Foram ainda construídas as curvas de calibração para glucose, xilose, celobiose, glicerol e xilitol (anexo IV).

3.6.2. Determinação dos açúcares redutores através do método DNS modificado

A quantificação dos açúcares redutores foi efetuada através do método DNS modificado. O processo consiste em adicionar a um tubo de ensaio:

- 1 mL de solução de tampão citrato 0,05 M;
- 0,5 mL de amostra, previamente diluída;
- 3 mL de reagente DNS modificado (preparado segundo o protocolo).

Agita-se bem a mistura e coloca-se o tubo num banho de água a ferver durante 5 minutos e, logo de seguida, num banho de gelo durante 5 minutos. Posto isto, pipeta-se 0,2 mL de mistura para uma cuvete e adiciona-se 2,5 mL de água destilada. Mede-se a absorvância num espectrofotómetro UV-Vis com um comprimento de onda a 540 nm, contra um branco de solução de tampão citrato 0,05 M que sofreu o mesmo tratamento das amostras. A quantidade dos açúcares redutores foi determinada através da equação da curva de calibração do DNS modificado, que relaciona a absorvância com a concentração de glucose para soluções-padrão conhecidas (NREL-LAP 006, 1996).

3.6.3. Método de Bradford

O teor proteico da solução de enzima foi calculado pelo método Bradford. O método consiste em adicionar a um tubo de ensaio 0,025 mL de amostra enzimática, já previamente diluída em tampão citrato, com 1 mL de reagente de Bradford. A mistura é agitada durante alguns segundos e deixada a repousar durante 20 minutos. De seguida coloca-se a mistura numa cuvete e efetua-se a leitura de absorvância a um comprimento de onda de 595 nm num espectrofotómetro UV-Vis, contra um branco de tampão que sofreu o mesmo tratamento das amostras. O valor obtido é aplicado a uma curva de calibração e retira-se a concentração de proteína em equivalentes de BSA (albumina de soro bovino). A curva de calibração foi calculada anteriormente com soluções de BSA conhecidas.

3.7. Reómetro

O estudo de reologia realizou-se num reómetro RheoStress 1, com um copo de medição Z34 Din53018 e um rotor cilíndrico Z34 DIN53019. A temperatura da amostra em estudo manteve-se constante a 38°C através de um banho de água com recirculação. Em cada ensaio utilizou-se 50 mL de amostra, selecionou-se um intervalo de valores de velocidades de corte e obtiveram-se os valores de torque, tensão de cisalhamento e viscosidade aparente.

O estudo realizou-se apenas para os ensaios com uma consistência de 22%. No início do processo SSF não foi retirado qualquer amostra uma vez que a mistura ainda estava sólida. Assim que a mistura se liquefez retiraram-se amostras periodicamente até ao final do processo.

A análise e tratamento dos dados realizou-se através do *software* do equipamento.

3.8. Parâmetros de *Scale-up*

De seguida encontram-se as equações matemáticas utilizadas no aumento de escala na produção de bioetanol [46, 47].

Tabela 11: Equações matemáticas utilizadas no aumento de escala.

Equações do modelo de <i>scale-up</i>	
$\text{Re}_i = \frac{N_i \rho D_i^2}{\eta}$	Equação 5
$\text{Re}_f = \frac{n d_f^2}{\nu}$	Equação 6
$\nu = \frac{\eta}{\rho}$	Equação 7
$v_t = \pi N_i D_i$	Equação 1
$P_f = N'_p \rho n^3 d_f^4 V_L^{1/3}$	Equação 8
$N_p = 70 \text{Re}_f^{-1} + 25 \text{Re}_f^{-0.6} + 1.5 \text{Re}_f^{-0.2}$	Equação 9
$\gamma = k N_i$	Equação 10
$\tau = -\eta \gamma$	Equação 11
$\text{Ph} = \frac{d_0}{d} \left[1 + 3 \log_{10} \left(\text{Re} * \frac{\pi}{2} \left[1 - \sqrt{1 - \frac{4}{\pi} \left(\frac{V_L^{1/3}}{d} \right)^2} \right] \right) \right]$	Equação 12
$\gamma_{\text{eff}} = L^{\frac{1}{n}+1} + \left(\frac{P/V_L}{K} \right)^{\frac{1}{n}+1} + \left(\frac{V_L^{1/3}}{d} \right)^{\frac{x}{n}+1} + \left(\frac{V_L^{1/3}}{d_0} \right)^{\frac{y}{n}+1}$	Equação 13

3.9. Parâmetros de fermentação

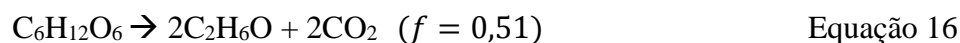
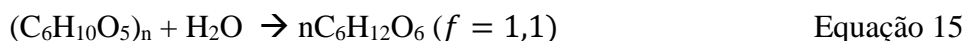
De forma a avaliar a influência de fatores ou variáveis alterados em cada ensaio e calcular a eficiência do SSF, foram calculados dois parâmetros de acompanhamento da fermentação: rendimento da conversão da biomassa em etanol, em % de rendimento teórico (NREL-LAP 008, 1995) e produtividade do processo fermentativo (g/L.h).

$$\text{Rendimento em etanol (\%)} = \frac{[\text{EtOH}]_t - [\text{EtOH}]_i}{0,51 \times 1,1 \times [\text{HC}]} \times 100\% \quad \text{Equação 14}$$

Onde:

- $[\text{EtOH}]_t$ – Concentração de etanol no tempo t da fermentação (g/L)
- $[\text{EtOH}]_i$ – Concentração de etanol no início da fermentação (g/L) ≈ 0
- $[\text{HC}]$ – Concentração de hidratos de carbono (g/L)
- 1,1 – Fator global de conversão mássica da celulose e hemicelulose em glucose e xilose
- 0,51 – Fator de conversão mássica da glucose (ou xilose) em etanol

Os fatores de conversão mássica utilizados resultam da reação de hidrólise da celulose (equação 15) e da reação da fermentação da glucose (equação 16).



A produtividade (g/L.h) foi calculada pela equação 17, que relaciona a concentração de etanol obtida num determinado tempo de reação com esse mesmo tempo.

$$P = \frac{[\text{EtOH}]_t}{t} \quad \text{Equação 17}$$

Onde:

- P – Produtividade (g/L.h)
- [EtOH]_t – Concentração de etanol no tempo t da reação (g/L)
- t – Tempo da reação (h)

De modo a comparar os ensaios realizados ao longo do trabalho em diferentes escalas e lamas primárias, calculou-se a razão entre a massa de etanol produzida e a massa de hidratos de carbono utilizada. A razão foi calculada através da equação 18.

$$R_{\text{EtOH/HC}} = \frac{[\text{EtOH}]_t}{[\text{HC}]} \quad \text{Equação 18}$$

Onde:

- R_{Et/HC} – Razão entre a massa de etanol produzida e a massa de hidratos de carbono utilizada (g_{EtOH}/g_{HC})

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Procedimento SSF

4.1.1. Ensaio em Erlenmeyer

- Efeito da minimização de água (tampão) utilizada na mistura reaccional

Os ensaios realizados tiveram como principal objetivo aumentar a concentração de etanol, minimizando a quantidade de água utilizada na mistura reaccional e aumentando a concentração de hidratos de carbono. Os diversos ensaios foram realizados em balões de Erlenmeyer de 250 mL utilizando como complexo enzimático a NS 22192 com uma carga enzimática de 15 FPU/g_{HC} e a levedura *S.cerevisiae* ATCC 26602, operando a 38°C e em descontínuo. Os ensaios da Fábrica 1 e 2 estão apresentados na tabela 5 e as quantidades utilizadas estão detalhadas no anexo III. Os valores da concentração de etanol foram obtidos através da análise dos cromatogramas resultantes das amostras injetadas no HPLC e os valores da concentração de equivalentes de glucose foram obtidos pelo método DNS. Estes valores estão representados na figura 7.

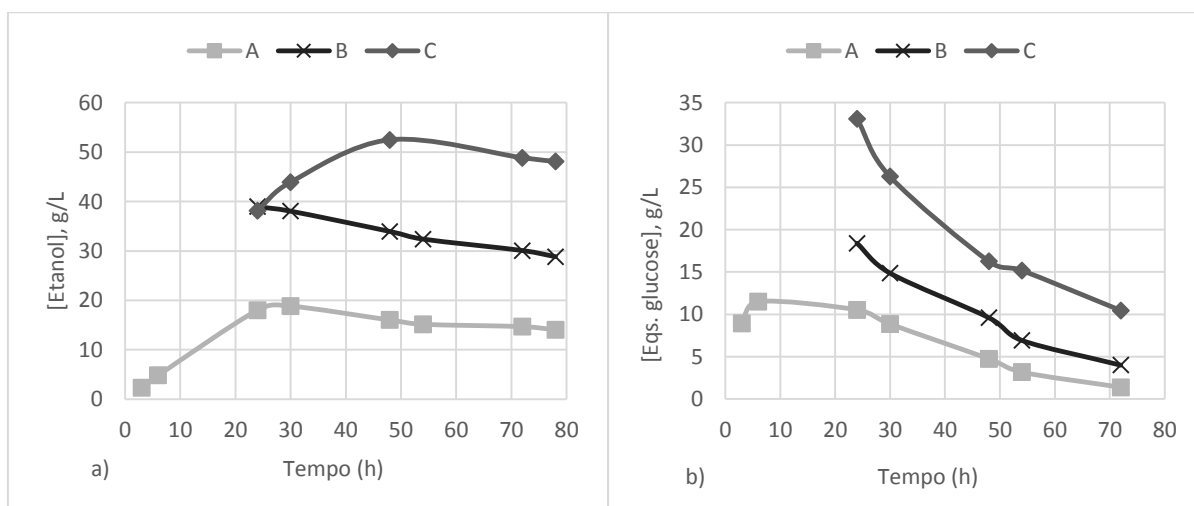


Figura 7: Evolução da concentração de a) etanol e b) açúcares redutores para os ensaios A, B e C utilizando uma consistência de 6,2%, 11,9% e 15,9%, respectivamente, usando a lama primária da Fábrica 1, em regime descontínuo.

A figura 7 representa a evolução da concentração de etanol e de açúcares redutores nos ensaios onde se utilizaram as lamas primárias da Fábrica 1 como matéria-prima. No ensaio A, a primeira amostra foi retirada após 3 h do início da reação, enquanto que nos ensaios B e C só foi possível retirar após 24 h, quando a mistura reacional se liquefez. O tempo que demorou a liquefazer deve-se à elevada carga de sólidos, o que acabou por dificultar a hidrólise da biomassa.

No ensaio A, verifica-se que a concentração de etanol na primeira amostra (3 h) era apenas de 2,3 g/L e a sua concentração de açúcares era de 8,9 g/L. Tendo em conta que inicialmente não existiam açúcares individuais, conclui-se que a velocidade de hidrólise enzimática foi superior à velocidade de sacarificação no início da reação. Após as 6 h, verifica-se que a velocidade da fermentação dos açúcares é superior à velocidade da formação dos mesmos, uma vez que a concentração de açúcares diminui ao longo do tempo. O valor da concentração de etanol atinge um máximo às 30 h, obtendo-se um valor de 18,8 g/L e posteriormente a sua concentração diminui até um valor de 14,1 g/L (t=78 h). Pela análise do gráfico, verifica-se que a partir das 30 h a concentração de açúcares continua a diminuir, mas a concentração de etanol não aumenta, o que leva a concluir que há formação de subprodutos a partir dos açúcares, como é o caso do xilitol (como se pode verificar no anexo V).

No ensaio B, a concentração de etanol atinge um máximo de 39,0 g/L às 24 h e posteriormente a sua concentração tende a diminuir até os 28,2 g/L (t=78 h). A concentração de açúcares é máxima na primeira amostra e diminui até aos 4,0 g/L (t=72 h). O ensaio B contém a mesma quantidade absoluta de hidratos de carbono que o ensaio A, apenas não se adicionou a solução tampão para perfazer os 100 mL, para aumentar a consistência. A concentração de etanol no ensaio B mais do que duplicou comparativamente ao ensaio A.

No ensaio C, aumentou-se a concentração de hidratos de carbono inicial (por aumento da quantidade de lamas e, conseqüentemente, da consistência), o que levou a um aumento da concentração de etanol para um máximo de 52,5 g/L após 48 h. A concentração de etanol levou mais tempo até atingir o seu máximo comparativamente com os restantes ensaios devido à elevada carga de sólidos, o que dificultou a hidrólise da biomassa.

A figura 8 representa a evolução da produção de etanol e a evolução da concentração dos açúcares redutores para os ensaios que utilizam como biomassa as lamas primárias da Fábrica 2.

Bioconversão integrada de lamas celulósicas em etanol: alterações processuais para o aumento da produtividade

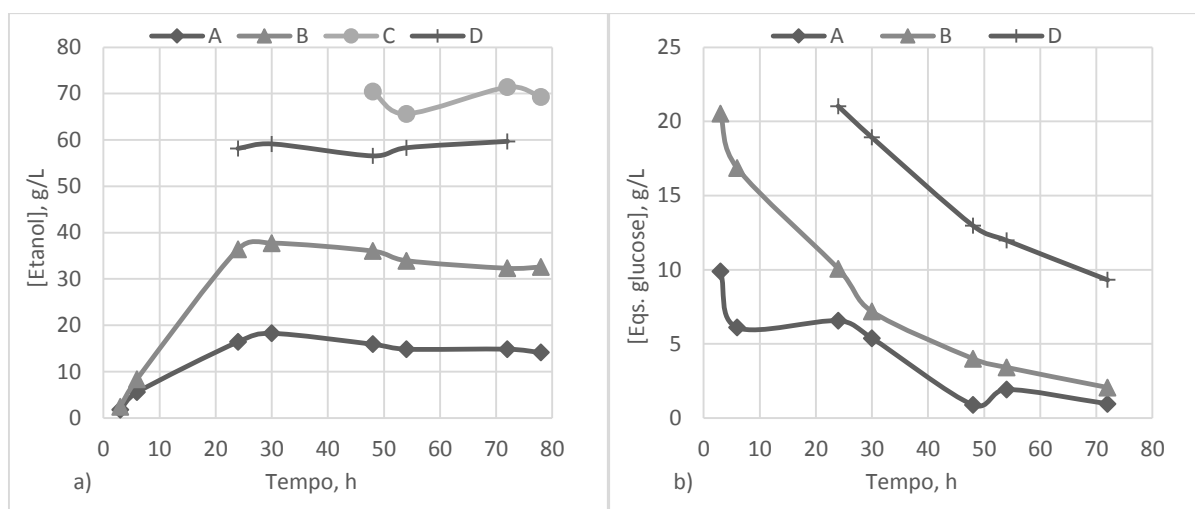


Figura 8: Evolução da concentração de a) etanol e b) açúcares redutores para os ensaios A, B, C e D utilizando uma consistência de 8,1%, 15,8%, 28,2% e 22%, respectivamente, usando a lama primária da Fábrica 2, em regime descontínuo.

Analisando a figura 8 verifica-se, no ensaio A, que a concentração de etanol não ultrapassa os 18,3 g/L, valor semelhante ao ensaio A das lamas da Fábrica 1. A concentração de açúcares atinge um valor máximo de 9,9 g/L na primeira amostra e a partir desse momento a concentração tende a diminuir para valores de 0,95 g/L.

No ensaio B, a primeira amostra foi retirada após 3 h, ao contrário do que aconteceu nas lamas da Fábrica 1 (onde apenas se retirou uma amostra às 24 h), apesar de ter uma consistência maior. A remoção da água (tampão) permitiu que no ensaio B a concentração de etanol mais do que duplicasse, atingindo um valor máximo de 37,7 g/L. Como era de esperar a concentração de açúcares aumentou e não teve efeitos negativos na reação de fermentação.

No ensaio C adicionou-se uma quantidade hidratos de carbono superior ao ensaio D. O aumento de $[HC]_i$ levou a uma concentração de etanol máxima de 71,4 g/L após 72h (semelhante à obtida logo às 48 h). De salientar que não foi possível retirar uma amostra antes das 48 h uma vez que a mistura ainda se encontrava sólida. Em cada amostra retirada não foi possível analisar os açúcares redutores uma vez que o volume retirado não era suficiente para realizar o método DNS.

No ensaio D aumentou-se a concentração de hidratos de carbono inicial, o que levou a uma concentração de etanol de 59,1 g/L após 30 h (um valor superior ao dos ensaios A e B e inferior ao do ensaio C, de acordo com as concentrações de hidratos de carbono e/ou consistências indicadas na tabela 5).

Na tabela 12 encontra-se um resumo dos valores obtidos para cada ensaio de ambas as lamas primárias utilizadas.

Tabela 12: Resultados obtidos nos ensaios de SSF das lamas primárias da Fábrica 1 (LP1) e da Fábrica 2 (LP2).

Lamas Primárias		[CH] _{inicial} (g/L)	Consistência % (p/p)	t (h)	[EtOH] (g/L)	P (EtOH) (g/(L h))	Y (EtOH) %	R _{Et/HC} (g/g)
LP1	A	50	6,2	30	18,8	0,63	67,2	0,38
	B	96	11,9	24	39,0	1,62	72,3	0,41
	C	126,5	15,6	48	52,5	1,09	74,0	0,42
LP2	A	50	8,1	30	18,3	0,61	65,3	0,37
	B	97,8	15,8	30	37,7	1,26	68,9	0,39
	C	174,5	28,2	48	70,5	1,47	72,0	0,40
	D	136,4	22	30	59,1	1,97	77,3	0,44

Através da análise da tabela 12 verifica-se que para ambas as lamas primárias testadas, LP1 e LP2, o aumento da consistência favoreceu os 3 parâmetros: concentração de etanol, produtividade e rendimento. Analisando o ensaio A conclui-se que para a LP2 é necessário uma quantidade maior de biomassa para se obter a mesma [CH]_i da LP1, o que leva a uma maior consistência. Esta diferença de consistências não tem influência na produção de etanol, obtendo-se valores semelhantes. Em relação a LP1 verifica-se uma maior concentração de etanol no ensaio C, mas em contrapartida a sua produtividade é inferior ao ensaio B. Em relação a LP2, ao considerar apenas o parâmetro [EtOH] conclui-se que as condições do ensaio C foram as mais promissoras, mas uma vez que se tem de considerar também o rendimento e a produtividade, verifica-se que o ensaio D reúne as melhores condições para o ensaio SSF. A baixa produtividade do ensaio C comparativamente ao ensaio D deve-se ao fato da elevada carga de sólidos dificultar a transferência de calor e massa no Erlenmeyer. Através da análise do parâmetro R_{Et/HC} conclui-se que das lamas utilizadas a que produziu uma quantidade maior de etanol por hidratos de carbono foi a LP2 no ensaio D.

A escolha das melhores condições para se realizar o processo SSF tem de ser um compromisso entre os três parâmetros: concentração de etanol, produtividade e rendimento. O rendimento máximo obtido nas experiências realizadas foi de 77,3%, um valor satisfatório considerando que a matéria-prima utilizada é um resíduo.

- Efeito da aplicação de pré-hidrólise (Semi-SSF ou S-SSF)

Os ensaios realizados tiveram como objetivo estudar a adição de uma etapa de pré-hidrólise. Numa fase inicial a temperatura de operação é de 50 °C em que apenas é adicionado o extrato enzimático NS 22192, com uma carga enzimática de 15 FPU/g_{HC}; posteriormente baixa-se a temperatura para os 38°C e adiciona-se a levedura *S.cerevisiae* ATCC 26602. Neste estudo foram aplicados diferentes tempos de pré-hidrólise (t_{ph}) aos ensaios C das LP1 e LP2, sendo apresentados na tabela 6. Na figura 9 observa-se a evolução da concentração de etanol e açúcares redutores no processo S-SSF para as lamas primárias da Fábrica 1.

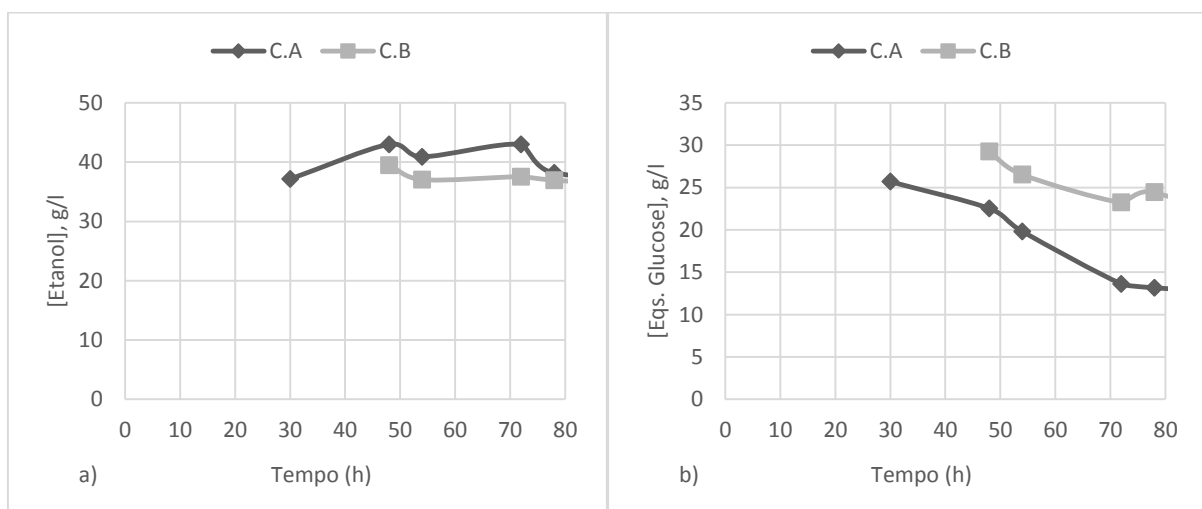


Figura 9: Evolução da concentração de a) etanol e b) açúcares redutores para os ensaios C.A e C.B utilizando um tempo de pré-hidrólise de 0,5 e 1 h, respectivamente, usando a lama primária da Fábrica 1.

De salientar que para t_{ph} superiores a 2 h não foi possível retirar qualquer amostra durante o processo uma vez que a biomassa não se liquefez. Através da observação da figura 9a) verifica-se que nos ensaios C.A e C.B a concentração máxima de etanol atingiu apenas 43 e 39,5 g/L, respetivamente, valores inferiores ao ensaio C do processo SSF em que a sua concentração atingiu 52,5 g/L. Na figura 9 verifica-se que com o aumento do t_{ph} a concentração de açúcares redutores aumenta e a concentração de etanol diminui, o que leva a concluir que: i) as condições de operação ou ii) algum composto formado pelas temperaturas elevadas iniciais, inibiu a levedura de produzir etanol.

Nos ensaios realizados com as LP2 aplicaram-se dois tempos de pré-hidrólise, um de 6 h e outro de 24 h (apresentado na tabela 6), cuja evolução da concentração de etanol e açúcares redutores pode ser analisada na figura 10.

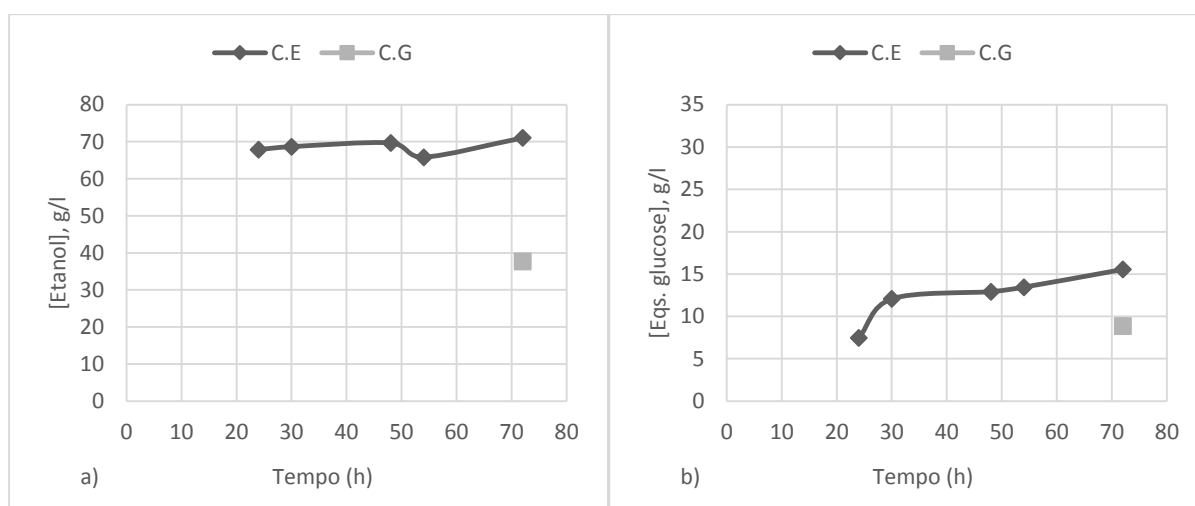


Figura 10: Evolução da concentração de a) etanol e b) açúcares redutores para os ensaios C.E e C.G utilizando um tempo de pré-hidrólise de 6 e 24 h, respetivamente, usando a lama primária da Fábrica 2.

Verifica-se na figura 10 que na LP2 foi possível produzir etanol para tempos de pré-hidrólise superiores a 6h, ao contrário da LP1, e isto dever-se-á à composição das lamas. As LP1 podem conter algum composto que iniba a ação da enzima.

Através da análise da figura 10 observa-se que no ensaio C.E foi possível retirar uma primeira amostra após 24 h (6h t_{ph} + 18h SSF), enquanto que no ensaio C.G apenas se retirou uma amostra às 72 h (24h t_{ph} + 48h SSF), sendo a sua concentração de etanol 67,9 g/L e 37,1 g/L, respetivamente. Comparando com o ensaio C da LP2, verifica-se que a adição do t_{ph} de 6h beneficiou ligeiramente a hidrólise da biomassa permitindo uma concentração máxima de 71 g/L e uma maior produtividade. Na figura 10 b) verifica-se que a concentração de açúcares redutores aumentou ligeiramente de 11,4 g/L para 15,5 g/L; neste caso a velocidade de hidrólise é ligeiramente superior à velocidade de fermentação, ou seja a formação açúcares hidrolisados é superior à sua conversão em etanol. Como mostra a figura 10 o aumento do t_{ph} de 6 para 24 h não beneficiou o processo SSF, na medida em que a biomassa apenas se liquefez após as 72 h, tendo-se obtido uma concentração de etanol mais baixa. Na tabela 13 encontra-se um resumo dos resultados obtidos do processo S-SSF para as LP1 e LP2.

Tabela 13: Resultados obtidos nos ensaios de semi-SSF das lamas primárias da Fábrica 1 e da Fábrica 2 (*) tempo decorrido desde a pré-hidrólise, usado para determinar a produtividade.

Lamas primárias		t de pré-hidrólise (h)	t ^(*) (h)	[EtOH] (g/L)	P (EtOH) (g/(L h))	Y (EtOH) %
LP1	C.A	0,5	48	43,0	0,60	60,6
	C.B	1	48	39,5	0,82	55,7
	C.C	2	-	-	-	-
	C.D	3	-	-	-	-
	C.E	6	-	-	-	-
	C.F	18	-	-	-	-
	C.G	24	-	-	-	-
LP2	C.E	6	18	67,9	2,83	69,3
	C.G	24	54	37,7	0,52	38,5

Observa-se na tabela 13 que para a LP1 apenas se obtiveram resultados nos ensaios C.A e C.B, com tempos de pré-hidrólise de apenas meia hora e uma hora, respetivamente. Na LP1 verifica-se que à medida que o tempo de pré-hidrólise aumenta a concentração de etanol máxima diminui, assim como o seu rendimento. Para as LP1 conclui-se que a adição de um tempo de pré-hidrólise não foi benéfico para a produção de etanol, tendo um efeito inibidor na levedura. Em relação à LP2, verifica-se que no ensaio C.E foi possível obter-se uma elevada produtividade de 2,83 g/L.h com um rendimento de 69,3%. No ensaio C.G o aumento do t_{ph} para 24 h não favoreceu a reação de fermentação e obteve-se uma concentração de etanol de apenas 37,7 g/L com uma produtividade de 0,52 g/L.h. Ao contrário do que aconteceu na LP1, é possível que a utilização de tempos de pré-hidrólise inferiores a 6 horas possa beneficiar a produção de etanol nas lamas primárias da Fábrica 2.

- Efeito da percentagem de inóculo utilizado

A fim de avaliar o efeito da percentagem de inóculo no processo SSF foram realizados diversos ensaios em balões de Erlenmeyer de 250 mL utilizando os ensaios C das lamas primárias da Fábrica 2. Em cada ensaio variou-se o volume de inóculo adicionado tendo o cuidado de se manter o volume de trabalho constante em 57 mL, ou seja, o volume total da mistura reacional é mantido constante através da manipulação do volume da solução de nutrientes adicionados (sendo a concentração total de nutrientes mantida constante); os ensaios estão apresentados na tabela 7. O perfil da concentração de etanol encontra-se representado na figura 11. Não tendo sido possível retirar amostra suficiente para determinar os açúcares redutores pelo método DNS, a concentração total de açúcares representada na figura 11b) consiste na soma da concentração de glucose e xilose obtida por HPLC.

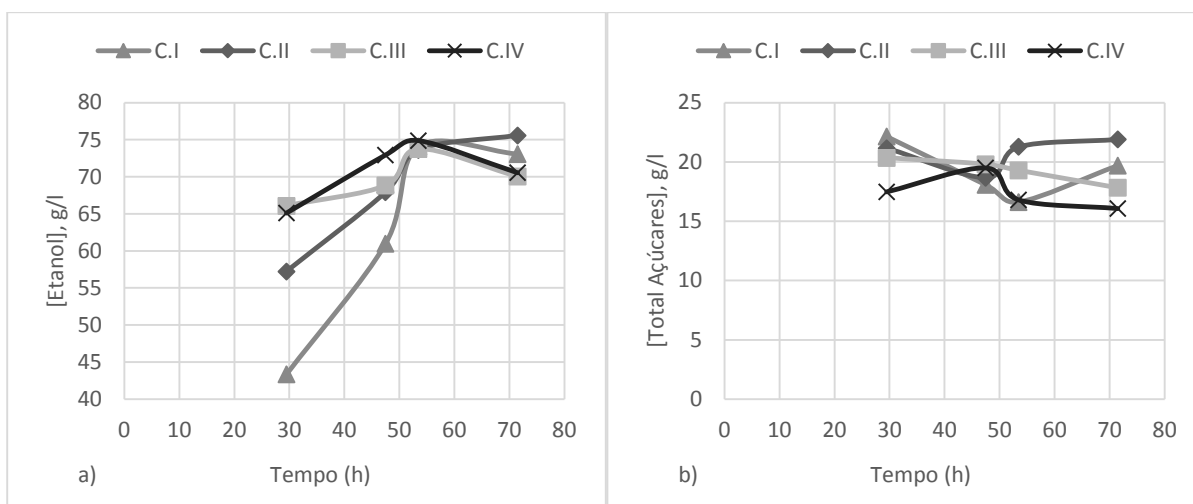


Figura 11: Evolução da concentração de a) etanol e b) açúcares redutores para os ensaios C.I, C.II, C.III e C.IV utilizando como percentagem de inóculo 10%,14%,17,5% e 19,6%, respetivamente, usando a lama primária da Fábrica 2.

Na figura 11 a) observa-se que no início do processo, à medida que a percentagem de inóculo aumenta, a concentração de etanol tende a aumentar. A maior quantidade de levedura presente no início do processo nos ensaios C.III e C.IV beneficiou a produção de etanol, uma vez que o número de microrganismos era superior, o que leva a uma maior conversão dos açúcares em etanol. Com o decorrer do tempo a concentração de etanol de cada ensaio tende a aumentar e em todos se atinge um máximo próximo de 74 g/L após 53,5 h. Após as 53,5h até ao fim do processo a concentração de etanol tende a diminuir exceto para o ensaio C.II.

Na figura 11 b) observa-se que o perfil de concentração total de açúcares difere ligeiramente de ensaio para ensaio, concluindo-se que a percentagem de inóculo não teve influência significativa na produção de açúcares.

Na tabela 14 está representado um resumo dos valores dos rendimentos percentuais, da produtividade e a concentração de etanol obtida para cada ensaio.

Tabela 14: Resultados obtidos nos ensaios de SSF das lamas primárias da Fábrica 2 (LP2).

Lamas Primárias		% inóculo	t (h)	[EtOH] (g/L)	P (EtOH) (g/(L h))	Y (EtOH) %
LP2	C.I	10	47,5	61,0	1,28	62,3
			53,5	74,1	1,39	75,7
	C.II	14	47,5	67,9	1,43	69,4
			53,5	73,7	1,38	75,2
	C.III	17,5	47,5	68,8	1,45	70,3
			53,5	73,8	1,38	75,3
	C.IV	19,6	47,5	73,0	1,54	74,5
			53,5	74,9	1,40	76,5

Através da análise da tabela 14 conclui-se que percentagem de inóculo não teve influência na concentração máxima de etanol obtida nos diversos ensaios. Analisando o ensaio C.III e comparando com o ensaio C (mesma % de inóculo) a sua concentração de etanol após 47,5 h e 48 h era de 68,8 e 70 g/L e a produtividade 1,45 e 1,47, respetivamente. O ensaio C.III é um duplicado do ensaio C, o que permitiu confirmar a viabilidade dos resultados obtidos. No ensaio C.IV a concentração de etanol após 48 h era de 73,0 g/L, tendo uma produtividade de 1,54 g/(L h). A maior percentagem de inóculo no ensaio C.IV permitiu a obtenção de uma concentração de etanol mais elevada em menor tempo. Assim sendo, conclui-se que a utilização de uma percentagem de inóculo de 19,6% favorece o processo SSF, na medida em que se obtém melhores produtividades.

- Efeito da minimização da carga enzimática

De modo a otimizar e reduzir os custos do processo estudou-se a minimização da carga enzimática no ensaio C das LP2 usando o extrato enzimático NS 22192 a 38°C, cujos resultados se encontram na tabela 8. Neste estudo foram estudadas diversas cargas enzimáticas: 15, 10 e 5 FPU/g_{HC}. Os resultados obtidos da concentração de etanol estão representados na figura 12. Não foi possível retirar amostra suficiente para determinar os açúcares redutores pelo método DNS, sendo a concentração total de açúcares representada na figura 12b) a soma da concentração de glucose e xilose analisada por HPLC.

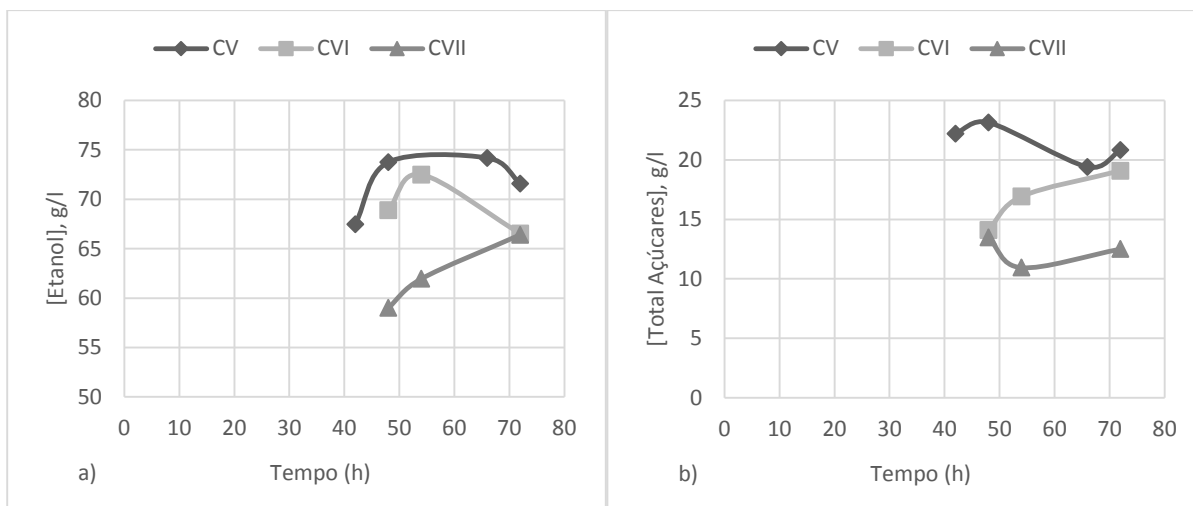


Figura 12: Evolução da concentração de a) etanol e b) açúcares redutores para os ensaios CV, CVI e CVII utilizando como carga enzimática 15,10 e 5 FPU/g_{HC}, respectivamente, usando a lama primária da Fábrica 2.

Observando a figura 12 a) verifica-se que houve uma diminuição no perfil de concentração de etanol à medida que a carga enzimática diminuiu. Nos ensaios C.V e C.VI verifica-se que a concentração de etanol em 48 h é de 73,8 e 68,9 g/L, respectivamente. No ensaio C.VI a concentração alcançou os 72,5 g/L às 54 h (6 h depois). O ensaio C.VII comparativamente com os anteriores obteve valores mais baixos e a sua concentração de etanol teve um máximo de 66,4 g/L após 72 h.

Analisando a figura 12 b) observa-se que com a diminuição da carga enzimática a concentração de açúcares tende a diminuir. A diminuição da concentração de açúcares não traduziu numa maior produção de etanol, o que leva a concluir que houve uma baixa velocidade de hidrólise.

Na tabela 15 está representado um resumo dos valores dos rendimentos percentuais, da produtividade e a concentração de etanol obtida para cada ensaio.

Tabela 15: Resultados obtidos nos ensaios de SSF das lamas primárias da Fábrica 2.

Lamas Primárias	Carga enzima (FPU/g _{HC})	t (h)	[EtOH] (g/L)	P (EtOH) (g/(L h))	Y (EtOH) %	
LP2	CV	15	48	73,8	1,54	75,3
		15	66	74,2	1,12	75,8
	CVI	10	48	68,9	1,44	70,4
		10	54	72,5	1,34	74,1
	CVII	5	54	62,0	1,15	63,3
		5	72	66,4	0,92	67,8

Pela análise da tabela 15 verifica-se que a minimização da carga enzimática de 15 para 10 FPU/g_{HC} não teve grande influência no rendimento. No entanto, teve como desvantagem a necessidade de mais tempo de reação para se obter uma concentração de etanol semelhante, o

que acabou por baixar a produtividade. A utilização de uma carga enzimática de 5 FPU/g_{HC} não favoreceu o processo SSF pois ambos os parâmetros diminuiram significativamente.

A diminuição da carga enzimática não trouxe qualquer benefício à produção de etanol, pelo que, de forma a garantir a eficiência do processo, a carga enzimática ideal a utilizar deve ser de 15 FPU/g_{HC}.

4.2. Reologia

Habitualmente as culturas microbiológicas são muitas vezes complexas e viscosas. As propriedades reológicas da suspensão podem ter um grande efeito na eficiência do processo, uma vez que para elevadas viscosidades o grau de turbulência tende a diminuir para uma dada velocidade de agitação, dificultando assim a transferência de massa e calor. A baixa turbulência pode ser compensada com o aumento da velocidade de agitação, o que conseqüentemente leva a um aumento de custos, porque se tem de fornecer uma maior potência. As propriedades reológicas do caldo fermentativo dependem essencialmente do substrato utilizado, assim como da sua concentração (normalmente cargas elevadas de sólidos tendem a provocar viscosidades maiores), dos produtos formados e dos microrganismos usados.

Nesta secção estudou-se a reologia da suspensão de um dos ensaios realizados anteriormente, o ensaio D com uma consistência de 22%, que foi utilizado como referência para o aumento de escala. A reologia da suspensão foi estudada através de um reómetro onde se estudou a viscosidade aparente através da aplicação de diversas velocidades de corte (γ). O desconhecimento das propriedades reológicas pode levar a condições desfavoráveis ao processo SSF, tornando o *scale-up* uma tarefa complicada.

Os fluidos não newtonianos podem ser descritos por diversos modelos, um modelo simples e muito utilizado é a lei da potência (*power law*) (40):

$$\tau = K|\gamma|^n \quad \text{Equação 19}$$

Alterando a equação de forma que a viscosidade aparente venha em função da velocidade de corte, obtém-se a lei de *Ostwald-de Waele*:

$$\eta_{app} = \frac{\tau}{\gamma} = K|\gamma|^{n-1} \quad \text{Equação 20}$$

Em que:

K = índice de consistência, Pa.s^m

n = índice de comportamento do fluido, adimensional.

Quando os fluidos são newtonianos, pseudoplásticos e dilatantes assim que uma tensão é aplicada este começa a escoar. O mesmo não acontece com os fluidos plásticos, uma vez que estes necessitam que a tensão aplicada exceda a tensão limite (τ_y) para que comece a escoar. O modelo *Herschel-Bulkley* é usado para caracterizar o comportamento destes fluidos (40):

$$\tau = \tau_y + K\gamma^n \quad \text{Equação 21}$$

Quando o fluido é um plástico *Bingham* o valor de n toma o valor de 1. Alterando a equação de forma a que a viscosidade aparente venha em função da velocidade de corte, tem-se:

$$\eta_{app} = K' + \frac{\tau_y}{\gamma} \quad \text{Equação 22}$$

A figura 13 mostra o perfil da tensão de cisalhamento à medida que se aumenta a velocidade de corte. Foram realizados três ensaios, em que a primeira amostra foi retirada após 17 h (assim que a mistura se liquefez), a segunda às 41 h e a última após 72 h do ensaio D.

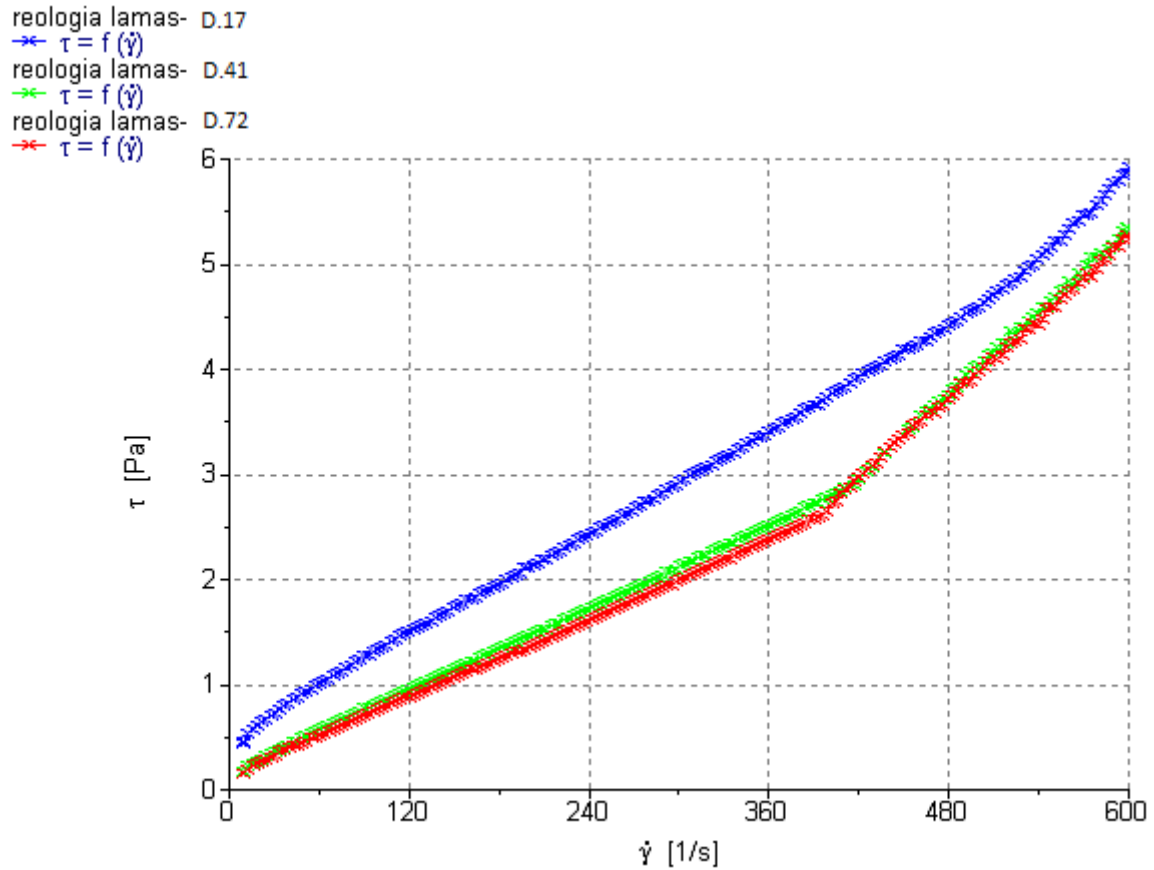


Figura 13: Perfil da tensão de cisalhamento em função da velocidade de corte para o ensaio D das LP2.

Através da análise da figura 13 verifica-se que, em todos os ensaios, o fluido tem um comportamento de um plástico *Bingham*, sendo que no ensaio D.17 o valor da tensão limite a aplicar para que o fluido comece a escoar é superior aos ensaios D.41 e D.17. Analisando os ensaios D.41 e D.17 verifica-se que para velocidades de corte elevadas o fluido exibe um comportamento dilatante ou *shear-thickening*. O perfil da viscosidade aparente em função da velocidade de corte encontra-se no anexo VI.

Na tabela 16 observam-se os parâmetros fornecidos pelo reómetro para as equações mencionadas acima.

Tabela 16: Representação dos parâmetros obtidos para cada amostra.

Amostras	Parâmetros	
	Ostwald-de Waele	<i>Herschel-Bulkley</i> (n=1)
D.17	$K = 0,1281$	$K' = 0,008895$
	$n = 0,54$	$\tau_y = 0,374$
	$r^2 = 0,98$	$r^2 = 0,99$
D.41	$K = 0,02746$	$K' = 0,006762$
	$n = 0,7547$	$\tau_y = 0,133$
	$r^2 = 0,96$	$r^2 = 0,98$
D.72	n.a	$K' = 0,006923$
		$\tau_y = 0,101$
		$r^2 = 0,85$

Pela observação da tabela 16, verifica-se que o modelo de *Herschel-Bulkley* é o que melhor define o perfil da viscosidade aparente em relação à velocidade de corte, uma vez que possui um r^2 mais próximo de 1, ou seja, os valores obtidos através da equação são os que se aproximam mais dos valores experimentais. Conclui-se que no ensaio D.72 o fluido não tem um comportamento de um plástico *Bingham* uma vez que o valor de r^2 , na equação 21, não toma o valor de 1.

4.3. Aumento de escala

A maioria dos processos bioquímicos nascem em balões de Erlenmeyer mas por vezes o grande desafio para os engenheiros é passar do laboratório para um processo industrial economicamente viável. Nesta secção será dado um pequeno passo nesse sentido.

Após o estudo da reologia das lamas primárias da Fábrica 2 é possível iniciar o estudo do aumento de escala em descontínuo a partir dos ensaios de Erlenmeyer com uma consistência de 22%, utilizando a *S. cerevisiae* ATCC 26602 com 15,6% de inóculo de levedura, e o complexo enzimático NS 22192 com uma carga 15 FPU/g_{HC}.

Os microrganismos são sensíveis a danos físicos e mecânicos; quando sujeitos a condições de elevada velocidade de agitação estes perdem as suas características, levando a um baixo rendimento do processo. Para que os microrganismos não sofram alterações, o parâmetro de *scale-up* utilizado deve ser a velocidade periférica do agitador (porque velocidades acima de 3,2 m/s podem danificar as células). Uma vez que o balão de Erlenmeyer e o reator agitado não possuem semelhança geométrica não é possível utilizar a velocidade periférica do agitador

como parâmetro de *scale-up*. Quando isto acontece um critério muito utilizado em processos anaeróbios é o de manter constante o número de Reynolds, uma vez que tem em conta as propriedades hidrodinâmicas do meio.

Hoje em dia existe pouca informação sobre o *scale-up* de um balão Erlenmeyer para um reator agitado. É importante que a viscosidade aparente permaneça consistente em ambas as escalas, pois o seu desconhecimento pode levar a condições desfavoráveis para o processo SSF. Um estudo recente [47] teve como objetivo quantificar e correlacionar as velocidades de corte efetivas em balões de Erlenmeyer para uma ampla gama de fluidos pseudoplásticos, em diversas condições de operação. A velocidade de corte efetiva pode ser calculada através da equação 13, calculada em função da potência volumétrica aplicada e da viscosidade aparente da mistura, baseando-se no teorema π de *Buckingham*.

No presente trabalho, a velocidade de corte efetiva foi calculada através da equação 13, em que se utilizam as constantes L, x e y já calculadas pela literatura [47]. As constantes têm o valor de $L = 2,06$, $x = -0,331$ e $y = 0$; o valor de y toma o valor de zero desde que haja uma mistura eficiente. Para isso, o líquido tem de se mover “*in-phase*”. Num balão de Erlenmeyer para valores de $Ph > 1,26$ (*Phase number*) o líquido move-se “*in-phase*”, caso contrário o líquido move-se “*out-phase*”. Quando isto acontece durante a agitação o líquido tende a ficar no fundo, o que leva a uma mistura e transferência de massa ineficiente. Os parâmetros podem ser utilizados perante as seguintes condições: balões de Erlenmeyer com capacidades entre 50-1000 mL; diâmetro de agitação da incubadora entre 25-100 mm; volume de trabalho entre 25-100 mL; P/V_L entre 0,71-15,1 kW/m³; K entre 49-23233 mPa.s^m; n entre 0,107-0,867. Uma vez que a incubadora orbital não possui um medidor de potência, terá de ser feito um cálculo iterativo para determinar a velocidade de corte efetiva. O cálculo consiste em definir um valor inicial para a viscosidade aparente, valor esse utilizado no cálculo do número de Reynolds (Equação 6) e posteriormente no cálculo do número de Newton ou número de potência (Ne ou Np) – Equação 9. Sabendo o valor de Ne é possível calcular o valor da potência (Equação 8), que depois é aplicado na Equação 13 e determina-se o valor da velocidade de corte associado. O valor obtido da velocidade de corte aplica-se na equação de Ostwald-de Waele (Equação 20) calculada pelo reómetro e retira-se um novo valor da viscosidade aparente. O novo valor calculado será utilizado para calcular um novo Reynolds e assim sucessivamente até o valor da velocidade de corte efetiva convergir, a metodologia de cálculo encontra-se esquematizado na figura 14.

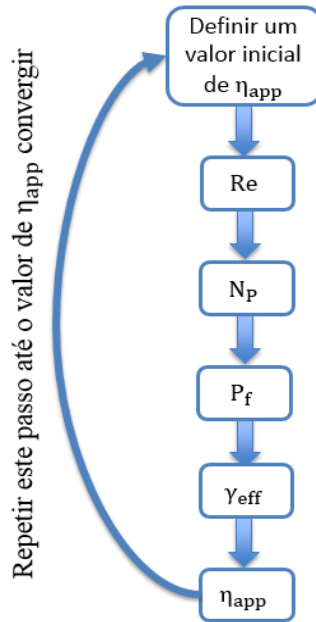


Figura 14: Metodologia de cálculo da γ_{eff} para o balão de Erlenmeyer.

Se a incubadora orbital possuísse um medidor de potência seria possível obter um perfil de velocidades de corte efetivas e viscosidades aparentes ao longo do tempo. Uma vez que isso não foi possível, serão calculadas duas velocidades de corte distintas, uma para a amostra D.17 e outra para a amostra D.41. Na tabela 17 encontram-se os valores dos parâmetros obtidos para ambas as amostras.

Tabela 17: Parâmetros obtidos para ambas as amostras no balão de Erlenmeyer.

Parâmetros	Amostras	
	D.17	D.41
d_f (m)	0,07	
d_0 (m)	0,02	
rpm	150	
n (rps)	2,5	
V_1 (m ³)	$5,7 \times 10^{-5}$	
ρ (kg/m ³)	1064	
Re_f (Eq 6)	785,18	1629,25
N_p (Eq 9)	0,94	0,68
P_f (W) (Eq 8)	0,01448	0,01045
P_f/V_1 (kW/m ³)	0,25	0,18
γ_{eff} (s ⁻¹) (Eq 13)	84,28	461,53
η_{app} (Pa.s) (Eq 20)	0,0166	0,006
Ph (<i>Phase number</i>)	1,79	2,17

Analisando a tabela 17 verifica-se que a velocidade de corte efetiva assim como o número de Reynolds aumenta com a diminuição da viscosidade aparente. Velocidades de corte efetivas entre 20 s^{-1} e 2000 s^{-1} podem ser esperadas em condições normais de fermentação em balões de Erlenmeyer [47]. Como era de esperar, o valor da P/V_L é superior na amostra D.17 uma vez que a sua viscosidade é superior. Verifica-se que em ambas as amostras o valor de Ph é superior a 1,26. Assim sendo, pode concluir-se que o fluido se move “*in-phase*”. Depois de identificado o número de Reynolds de ambas as amostras pode prosseguir-se para o *scale-up* do tanque agitado. O método de cálculo da velocidade de agitação em rpm para o VP (1,1 L) encontra-se esquematizado na figura 15, a velocidade é calculada da seguinte forma:

- O número de Reynolds é mantido constante, para cada amostra.
- Define-se uma viscosidade aparente e calcula-se a velocidade de agitação (Equação 1) e respetiva velocidade de corte. A velocidade de corte é calculada através da equação 10, em que o valor de N_i é a velocidade de agitação em rps e o valor de k é uma constante que depende apenas da geometria do agitador a qual varia normalmente entre 10 e 13 [48]. Definiu-se o valor de k em 12.
- De seguida consulta-se a tabela dos dados fornecidos pelo reómetro (anexo VII) e retira-se o valor da viscosidade aparente correspondente à velocidade de corte calculada.
- O valor da viscosidade aparente retirado da tabela é utilizado para calcular um novo valor de velocidade de agitação e assim sucessivamente até o valor da viscosidade aparente convergir.

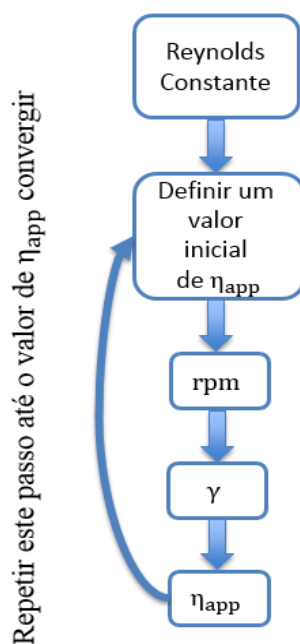


Figura 15: Metodologia de cálculo das rpm para o vaso reacional pequeno.

A tabela 18 apresenta os valores calculados para vaso reacional pequeno tendo em conta as condições da amostra D.17 e D.41.

Tabela 18: Parâmetros obtidos para ambas as amostras para o reator de VP 1,1 L.

Parâmetros	Amostras	
	D.17	D.41
D_i (m)	0,06	
Re_i	785,18	2172,33
η_{app} (Pa.s)	0,019	0,0098
N_i (rps)	3,9	5,6
rpm	234	333
γ (s⁻¹)	46,74	66,69

Na tabela 18 verifica-se que as velocidades de corte calculadas para o VP (1,1 L) foram inferiores aos valores obtidos no ensaio Erlenmeyer, o que segundo a literatura [47] é expectável, uma vez que a velocidade de corte no balão de Erlenmeyer pode ser pelo menos 1,55 vezes superior ao do tanque de agitação, dependendo do índice de comportamento do fluido (n). Na amostra D.17 e D.41 obtiveram-se duas velocidades de agitação distintas, 234 rpm e 333 rpm, respetivamente. Ambas as velocidades poderiam ser utilizadas durante o processo SSF no reator de 1,1 L, em que numa fase inicial seria utilizada uma velocidade de agitação de 234 rpm e posteriormente, após as 17 h, essa velocidade aumentaria para os 333

Bioconversão integrada de lamas celulósicas em etanol: alterações processuais para o aumento da produtividade

rpm. Numa primeira experiência a velocidade utilizada ao longo de todo o processo foi de 234 rpm, tendo como objetivo verificar se a velocidade mínima era suficiente para fornecer as condições hidrodinâmicas desejadas à fermentação. De salientar a dificuldade de controlar a velocidade de agitação durante o início do processo devido à mistura estar no estado sólido, como mostra a figura 16.

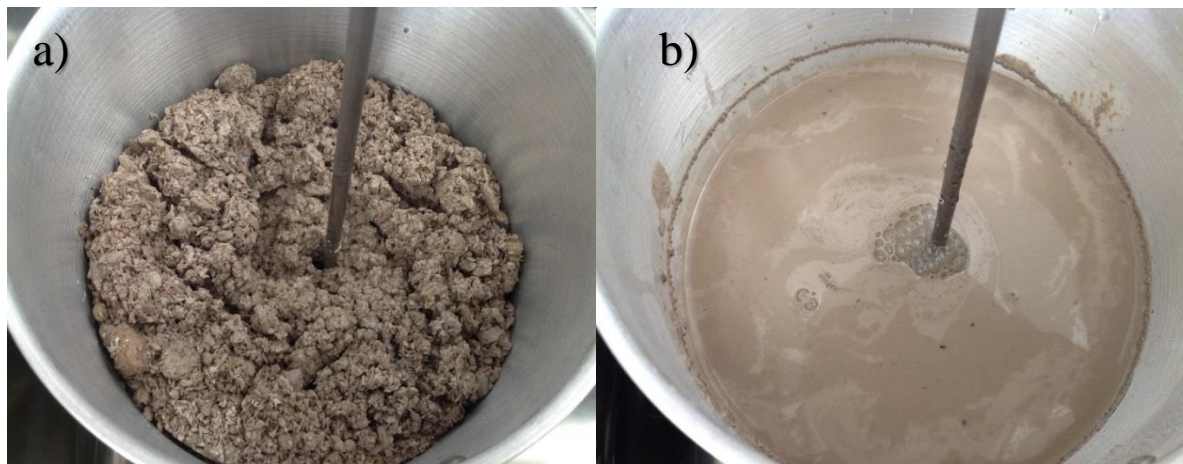


Figura 16: Mistura reacional a) no início do processo SSF e b) após liquefazer.

Uma vez selecionada a velocidade de rotação é possível calcular a velocidade de agitação periférica v_t para o VP, através da equação 1. O valor obtido será mantido constante para o *scale-up* dos restantes biorreatores. A viscosidade aparente e o respetivo Reynolds são calculados tendo em conta a velocidade de corte (no biostato o valor de k toma o valor de 10) em cada biorreator. Os cálculos referenciados na tabela 19 foram calculados tendo por base apenas a reologia da amostra D.17

Tabela 19: Resumo do comportamento reológico da mistura e parâmetros hidrodinâmicos para o balão de Erlenmeyer e para os reatores agitados, tendo como base a amostra D.17.

Reologia da mistura e parâmetros hidrodinâmicos	Balão de Erlenmeyer	VP 1.1L	VG 3.4L	Biostato 5L
rpm	150	234	127	216
Ni (rps)	2,5	3,9	2,12	3,6
v_t	n.a	0,73	0,73	0,73
Re _i	785,18	785,18	1032,1	734,62
γ (s ⁻¹)	84,28	46,74	25,49	35,95
η_{app} (Pa.s)	0,017	0,019	0,027	0,022

De salientar que os parâmetros calculados na tabela 19 não são constantes ao longo do tempo, estes valores dizem respeito apenas às propriedades reológicas da amostra D.17. A viscosidade da mistura tende a diminuir ao longo do tempo de reação (não variando muito entre as 47h e as 72h) sendo que no final do processo o número de Reynolds será superior ao calculado na tabela 19.

Os ensaios do aumento de escala estão apresentados na tabela 9 e as quantidades utilizadas estão detalhadas no anexo VIII. Na figura 17 encontram-se os perfis de concentração de etanol e açúcares redutores obtidos utilizando-se diferentes biorreatores.

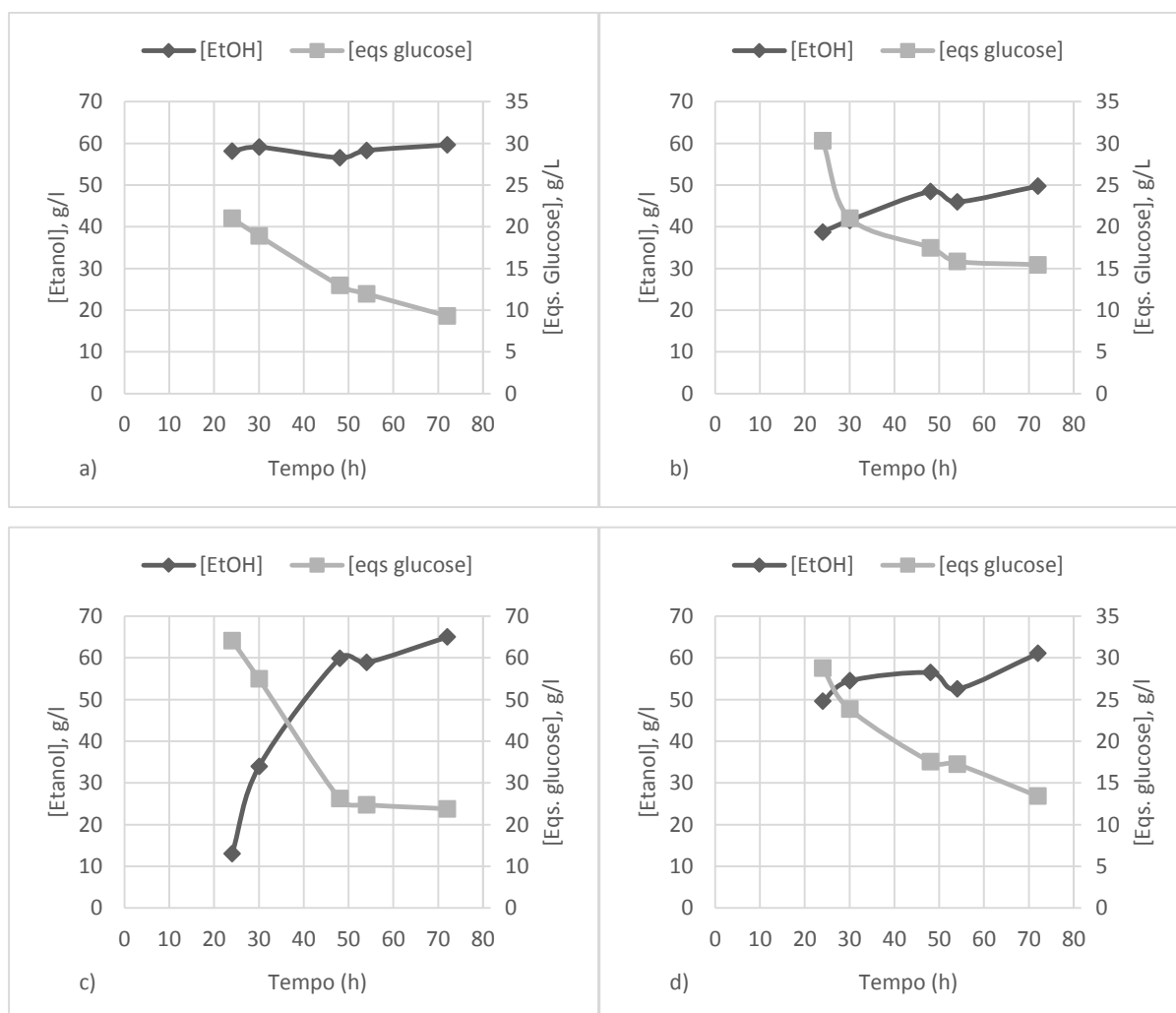


Figura 17: Evolução da concentração de etanol e açúcares redutores no processo SSF para a) ensaio D - balão de Erlenmeyer, b) VP, c) VG, d) biostato, usando a lama primária da Fábrica 2 com uma consistência de 22%.

Através da análise da figura 17b) verifica-se que a concentração de etanol ao longo de todo o processo é inferior ao ensaio D, atingindo um máximo de apenas 49 g/L. Em relação aos açúcares redutores verifica-se que na primeira amostra a sua concentração era de 30,3 g/L, enquanto que na figura a) a sua concentração é de 21 g/L. As menores concentrações de etanol

no ensaio VP comparativamente com o ensaio D (do balão de Erlenmeyer) deve-se ao fato de as condições da mistura não serem favoráveis à fermentação, uma vez que houve produção de açúcares mas que estes não foram convertidos eficientemente em etanol. O cálculo dos parâmetros hidrodinâmicos através da equação 13, em que se utilizaram as constantes L , x e y calculadas pela literatura e o fato de se ter utilizado o ensaio D.17 como referência pode ter levado a condições hidrodinâmicas desfavoráveis à reação de fermentação, levando a um baixo rendimento.

Na figura 17c) observa-se que no início do processo houve uma baixa formação de etanol e que a partir das 24 h e até às 48 h a concentração de etanol aumenta rapidamente, atingindo um valor de 59,9 g/L. No fim do processo, após 72 h atinge-se um máximo de 65 g/L. A primeira amostra revela que a concentração de açúcares redutores é de 64 g/L, uma concentração elevada comparativamente aos outros ensaios, o que traduz numa velocidade de reação de sacarificação superior à velocidade de reação de fermentação, no início do processo.

Na figura 17d) a concentração de etanol no biostato cresceu gradualmente de 49,6 g/L da primeira amostra até ao final do processo obtendo-se 61,0 g/L. A concentração de açúcares redutores decresce ao longo do processo até um mínimo de 13,4 g/L, ou seja, o consumo de açúcares é superior à sua formação.

Na figura 18 encontra-se um resumo da figura 17 com a evolução da concentração de etanol para os ensaios D-Erlenmeyer, VP, VG e Biostato.

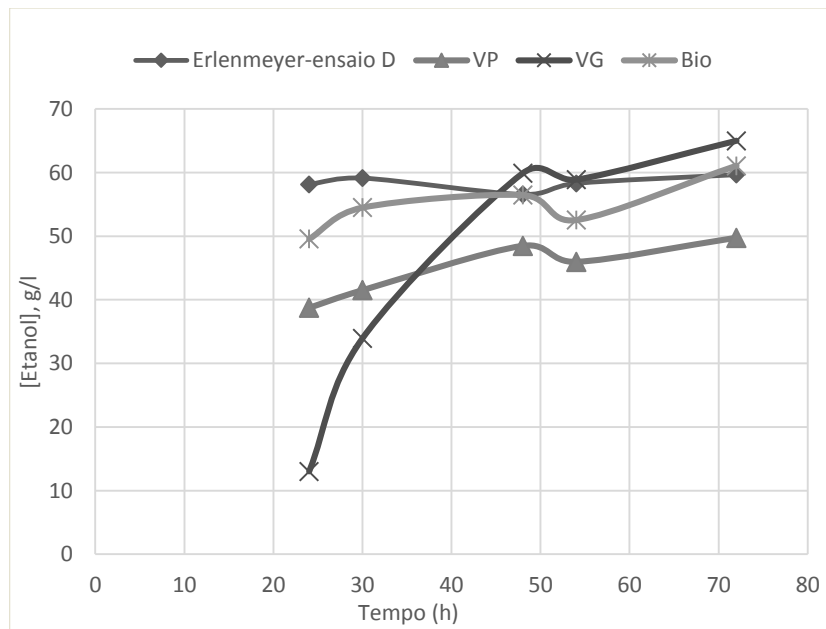


Figura 18: Evolução da concentração de etanol para os ensaios D-Erlenmeyer (velocidade orbital 150 rpm), VP (234 rpm), VG (127 rpm) e Biostato (216 rpm) usando a LP2 com uma consistência 22%.

Na figura 18 pode-se comparar os diferentes perfis de concentração dos ensaios realizados no aumento de escala e verifica-se que o ensaio VP foi o que obteve uma concentração de etanol menor. No ensaio VG verifica-se no início da reação que a velocidade de fermentação é baixa mas após 48h de reação verifica-se que a concentração de etanol supera a do ensaio D-Erlenmeyer. No ensaio Biostato verifica-se que no início a concentração é ligeiramente inferior ao ensaio D-Erlenmeyer mas após as 48h de reação a concentração de etanol é semelhante.

Na tabela 20 encontra-se um resumo dos resultados obtidos em cada ensaio no aumento de escala.

Tabela 20: Resumo dos resultados obtidos nos ensaios de SSF das lamas primárias da Fábrica 2 (LP2) no aumento de escala.

Lamas Primárias		Velocidade de Agitação (rpm)	t (h)	[EtOH] (g/L)	P (EtOH) (g/(L h))	Y (EtOH) (%)	R _{Et/HC} (g/g)
LP2	Ensaio D - Erlenmeyer	Agitação orbital (150 rpm)	30	59,1	1,97	77,3	0,44
	VP	234	48	48,5	1,01	63,4	0,36
	VG	127	48	59,9	1,25	78,4	0,44
	Biostato	216	30	54,5	1,82	71,2	0,41

Através da análise da tabela 20 verifica-se que a “replicação” dos ensaios de Erlenmeyer para o vaso reacional pequeno de 1,1 L, em que se manteve o número de Reynolds constante, não foi bem-sucedido, uma vez que tanto a concentração de etanol assim como a produtividade diminuiu significativamente. Nos restantes biorreatores, em que se manteve a v_{tip} constante, os resultados obtidos foram superiores aos obtidos no VP e semelhantes aos ensaios de Erlenmeyer. Dos ensaios realizados, aquele onde se obtiveram melhores resultados foi no Biostato. Mesmo com uma concentração de etanol ligeiramente inferior ao VG, a sua produtividade é superior. Através da análise do parâmetro R_{Et/HC} verifica-se que dos ensaios realizados, o ensaio VG foi o único que produziu uma quantidade absoluta de etanol igual ao ensaio D, enquanto que no biostato o valor obtido é ligeiramente inferior.

De seguida são enumeradas algumas causas que podem ter contribuído para a diferença de resultados entre cada biorreator:

- Condições anaeróbias: O processo SSF não necessita de condições estritamente anaeróbias. Tem de haver uma quantidade mínima de oxigénio dissolvida no caldo para que a levedura possa multiplicar-se, mas ao mesmo tempo tem de haver uma carência de oxigénio para que a levedura consiga fermentar os açúcares hidrolisados. No caso do VP e VG, as condições anaeróbias em certos períodos podem não ter sido asseguradas,

uma vez que a tampa possui um orifício que permite a entrada do veio de agitação. O orifício leva a que haja trocas gasosas com o meio admitindo a entrada de oxigênio, que mesmo com a sua baixa solubilidade em água, pode eventualmente não favorecer a reação de fermentação. Além disto, no início do processo, tanto no VP como no VG as tampas foram frequentemente abertas de forma a controlar a agitação uma vez que a mistura permanecia em estado sólido. No caso do VG os resultados obtidos foram superiores aos do VP, isto deve-se ao fato de o volume de trabalho do VG ser superior o que dificulta a solubilidade do oxigênio. No biostato as condições anaeróbias foram facilmente mantidas uma vez que o reator estava completamente vedado, em que apenas tinha uma saída para libertar os gases formados do processo, sem que permitisse a entrada de ar.

- Princípio da semelhança: Um pré-requisito básico no *scale-up* é o princípio da semelhança e verifica-se através da análise da tabela 11 que, entre cada reator não existe uma grande semelhança geométrica uma vez que o D_v/D_i não é constante.
- Condições hidrodinâmicas: As condições hidrodinâmicas variam de reator para reator, como mostra os valores de Re_i e γ na tabela 19, para além de não serem constantes ao longo do tempo de reação.
- Heterogeneidade das lamas primárias: A matéria-prima utilizada nos ensaios consiste num resíduo e a sua composição pode variar de lote para lote.

Em cada ensaio realizado nos biorreatores agitados as lamas primárias foram esterilizadas antes do processo, mas durante o processo as condições de assepsia não foram mantidas.

- Efeito da velocidade de agitação

De forma a estudar o efeito da velocidade de agitação nas reações de sacarificação e fermentação, realizaram-se três ensaios, um no VP e dois no VG, encontram-se apresentados na tabela 9. No VP utilizou-se uma velocidade de agitação inicial de 234 rpm e após 24 h diminuiu-se para 100 rpm. No VG utilizou-se uma velocidade inicial de 200 rpm e posteriormente diminuiu-se para 127 rpm. Um outro ensaio realizado na VG consistiu na utilização de uma velocidade de agitação de 200 rpm durante todo o processo. A evolução da concentração de etanol e açúcares redutores para as amostras VP_v e VG_v encontra-se representado na figura 19.

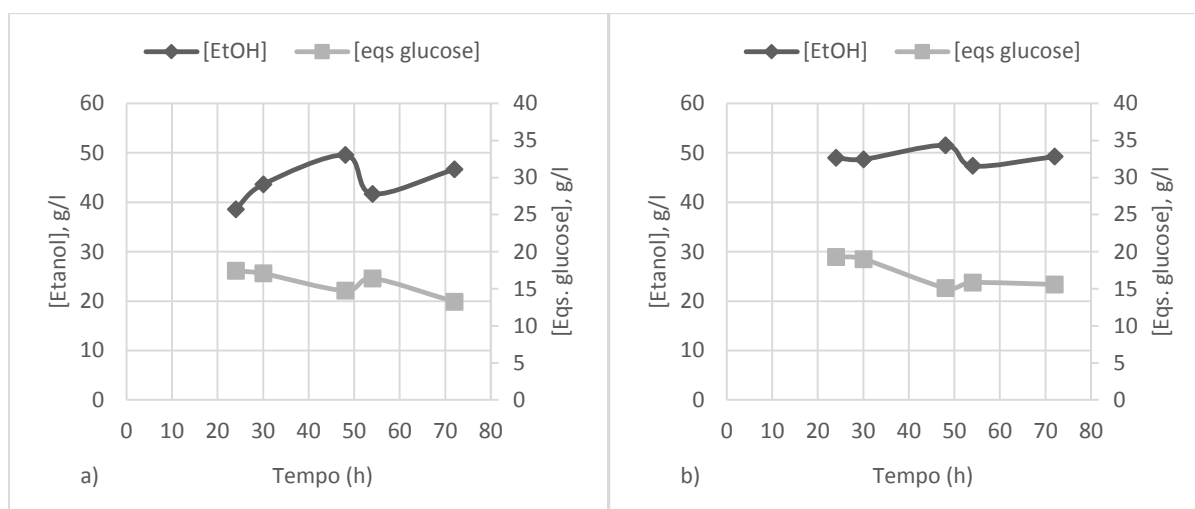


Figura 19: Evolução da concentração de etanol e de açúcares redutores das amostras a) VP_v 234/100 rpm e b) VG_v 200/127 rpm.

Na figura 19a) observa-se que a concentração máxima obtida de etanol foi de 49,6 g/L em 48 h. Analisando a figura 19a) e 17b), conclui-se que a alteração da velocidade de rotação após as 24 h para 100 rpm não teve influência na concentração de etanol. Seria de esperar que a diminuição da velocidade de agitação tivesse um efeito negativo ou positivo, uma vez que a agitação promove a transferência de calor e massa ao longo do reator. Uma menor agitação podia dificultar o fornecimento de oxigênio às células e com isto favorecer a reação de fermentação.

Através da análise da figura 19b) verifica-se que a concentração de etanol atinge um máximo de 51,5 g/L após 48 h, valor inferior ao obtido no ensaio VG 127 rpm (figura 17c). Analisando a figura 19b) e 17c) conclui-se que o aumento da velocidade de agitação favoreceu a fermentação no início do processo, mas por algum motivo com a diminuição da velocidade a concentração de etanol não aumentou significativamente. Ao analisar a figura 19b) e 17c) verifica-se que a concentração de equivalentes de glucose após 48 h é de 15,1 g/L e 26,2 g/L, respetivamente. A menor concentração de açúcares redutores leva a concluir que estes foram convertidos em subprodutos, o que levou a uma menor concentração de etanol. A evolução da concentração de etanol e açúcares redutores para a amostra VG_A encontra-se representado na figura 20.

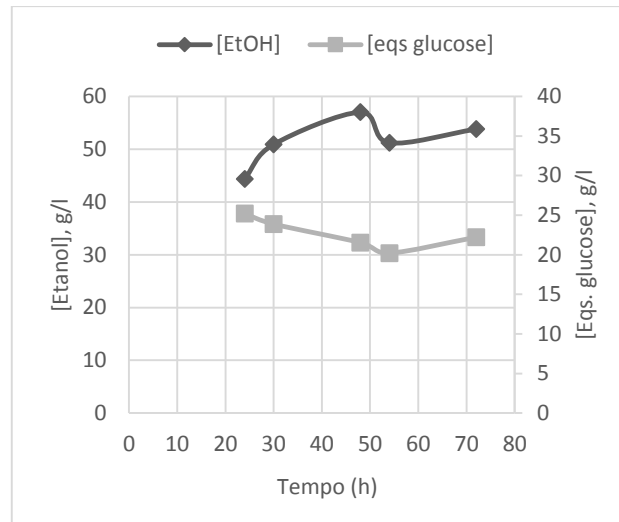


Figura 20: Evolução da concentração de etanol e de açúcares redutores da amostra VG_A com uma velocidade de agitação de 200 rpm.

Na figura 20 verifica-se que mantendo a velocidade de agitação em 200 rpm permitiu que a concentração máxima de etanol atingisse os 57,04 g/L, valor superior ao obtido no VG_v . Comparando a figura 20 com a figura 17 c) verifica-se que no ensaio VG_A que no início do processo até o tempo de reação atingir as 48h que a concentração de etanol foi superior, posteriormente a velocidade de agitação não favoreceu o processo SSF e a concentração de etanol diminuiu. O perfil de concentração dos açúcares redutores foi ligeiramente superior no ensaio VG_A comparativamente com o ensaio VG_v , pelo que a maior velocidade de agitação favoreceu a reação de hidrólise.

Ao analisarmos as figuras 17 c), 19 b) e 20 verifica-se que há uma redundância nos valores obtidos. No ensaio VP_v em que se utilizou uma velocidade de rotação de 127 rpm após as 24h verifica-se que o perfil de concentração de etanol é inferior ao ensaio VP . Um argumento plausível para tal acontecimento seria a utilização da velocidade de 200 rpm no início do processo ter danificado os microrganismos ou favorecido a produção de compostos inibidores à formação de etanol. Em contrapartida, ao analisar o ensaio VP_A , o argumento mencionado anteriormente fica sem validade uma vez que, com uma velocidade de 200 rpm durante todo o processo, foi possível obter uma concentração de etanol semelhante ao ensaio VP para um tempo de reação de 48h. No ensaio VG , ao contrário dos restantes, a concentração de etanol continua a aumentar após as 48h, atingindo um valor de 65 g/L ($t=72$), um valor que dificilmente será reproduzido.

A tabela 21 apresenta as concentrações de etanol assim como a produtividade e rendimento para os ensaios do VP_v , VG_v e VG_A em que se variou a velocidade de agitação.

Tabela 21: Resumo dos resultados obtidos nos ensaios de SSF das lamas primárias da Fábrica 2 (LP2) para os ensaios VP e VG em que se variou a velocidade de agitação ao longo do processo.

Lamas Primárias		Velocidade de Agitação (rpm)	t (h)	[EtOH] (g/L)	P (EtOH) (g/(L h))	Y (EtOH) %	R _{Et/HC} (g/g)
LP2	VP _v	234/100	24	38,5	1,61	50,5	0,28
			48	49,6	1,03	64,9	0,36
	VG _v	200/127	24	49	2,04	64,1	0,36
			48	51,5	1,07	67,4	0,38
	VG _A	200	24	44,4	1,85	58,1	0,33
			48	57	1,19	74,6	0,42

Observando a tabela 21 verifica-se, nos ensaios VP_v e VG_v, que a alteração da velocidade de agitação em nada beneficiou a concentração de etanol, não se obtendo rendimentos superiores a 70%. O aumento da velocidade no VP_v apenas beneficiou a produtividade, ou seja, foi necessário menos tempo de reação para se obter a concentração de etanol de 49 g/L. No ensaio VG_A o rendimento e a produtividade foi superior ao ensaio VG_v mas inferiores aos obtidos no ensaio VG. Através da análise do parâmetro R_{Et/HC} verifica-se que apenas o ensaio VG_A se aproxima do valor 0,44 obtido no ensaio D, nos restantes a quantidade de etanol absoluta formada foi inferior, o que leva a concluir que a alteração da velocidade de rotação não beneficiou a produção de etanol.

o Efeito da geometria de agitação

Em estudos realizados anteriormente a mistura do caldo tem sido realizada através de uma agitação axial, nos ensaios VP e VG o agitador utilizado foi uma hélice marinha de 4 pás, à exceção do biostato em que se utilizou um veio com dois agitadores, um agitador *Rusthon* e um *Propeller* com pás inclinadas. Nos ensaios que se seguem, apresentados na tabela 9, estudaram-se dois tipos preferenciais de escoamento: laminar e turbulento. No vaso reacional pequeno (VP) estudou-se o escoamento turbulento utilizando um agitador radial enquanto que no reator de acrílico (RA) estudou-se o escoamento laminar. Os ensaios VP e RA usaram como agitador um *paddle* e uma vareta helicoidal, respetivamente. O estudo do escoamento radial não foi realizado no VP uma vez que a altura deste não era suficiente para cobrir a vareta helicoidal. A evolução da concentração de etanol e açúcares redutores para as amostras VP_p e RA encontra-se na figura 21.

Bioconversão integrada de lamas celulósicas em etanol: alterações processuais para o aumento da produtividade

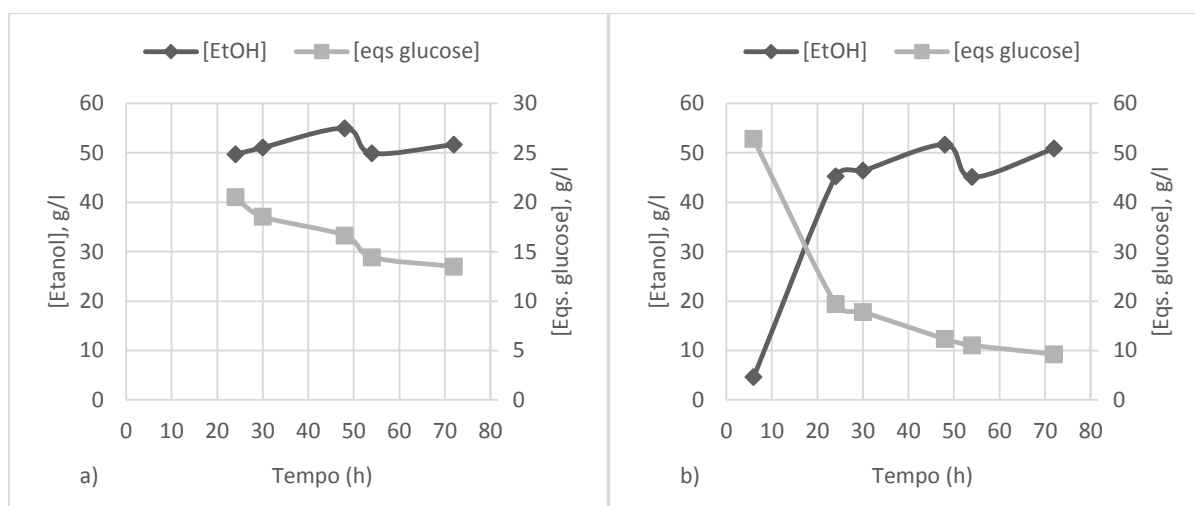


Figura 21: Evolução da concentração de etanol e de açúcares redutores das amostras a) VP_p 234 rpm com *Paddle* e b) RA 200 rpm com a vareta helicoidal.

Através da análise da figura 21a) verifica-se que a concentração de etanol atingiu um máximo de 55,0 g/L após 48 h, um crescimento significativo comparativamente com a figura 17b) em que se utilizou um agitador axial.

Observando a figura 21b), verifica-se que foi possível retirar uma primeira amostra nas primeiras 6 h de operação, em que a concentração de etanol era de apenas 4,6 g/L, enquanto que a concentração de equivalentes de glucose era de 52,8 g/L. Houve uma rápida hidrólise da biomassa em açúcares, ao contrário da sua conversão em etanol. À medida que o tempo decorre a concentração de etanol tende a aumentar atingindo um máximo de 51,7 g/L após as 48 h, altura em que a concentração de açúcares era de apenas 12,3 g/L.

Na tabela 22, encontra-se um resumo dos resultados obtidos para os ensaios VP e RA em que se utilizou outro tipo de geometria de agitação.

Tabela 22: Resumo dos resultados obtidos nos ensaios de SSF das lamas primárias da Fábrica 2 (LP2) para os ensaios VP e RA em que se variou a geometria de agitação.

Lamas Primárias	Geometria de Agitação	Velocidade de Agitação (rpm)	t (h)	[EtOH] _{MAX} (g/L)	P (EtOH) (g/(L h))	Y (EtOH) (%)	R _{EVHC} (g/g)	
LP2	VP _p	<i>Paddle</i>	234	48	55,0	1,15	71,9	0,40
	RA	Vareta helicoidal	200	48	51,7	1,08	67,5	0,38

Analisando a tabela 22 verifica-se que no ensaio VP_p que a concentração máxima de etanol de 55 g/L e um rendimento de 71,9% foi superior aos ensaios VP_v e VP, o que leva a concluir que a agitação radial beneficiou o processo SSF. No ensaio RA a utilização da vareta helicoidal permitiu uma rápida hidrólise da biomassa, como mostra a figura 21 b), mas não

traduziu numa elevada concentração de etanol, obtendo-se apenas um rendimento de 67,5%.
Através da análise do parâmetro $R_{Et/HC}$ verifica-se que em ambos os ensaios o valor obtido foi inferior ao obtido no ensaio D (0,44).

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES DE TRABALHO FUTURO

O presente trabalho teve como principal objetivo a valorização dos resíduos lenho-celulósicos. Neste caso, utilizaram-se as lamas primárias, provenientes de duas fábricas de pasta e papel, como matéria-prima para a produção de bioetanol através da estratégia SSF. A sua valorização foi possível através dos seguintes estudos:

- Avaliação do potencial das lamas primárias, utilizando diversas cargas de sólidos, utilizando como extrato enzimático a NS 22192 e a levedura *S. cerevisiae* ATCC 26602 a 38°C em balões de Erlenmeyer: o aumento da consistência mostrou-se promissor uma vez que tanto a concentração de etanol como a produtividade aumentaram.
- Avaliação da adição de uma fase de pré-hidrólise ao processo SSF: para as lamas da Fábrica 1, verificou-se que à medida que o tempo de pré-hidrólise aumenta a concentração de etanol diminui; para tempos superiores a duas horas não se verificou produção de etanol permanecendo a biomassa sólida. O mesmo não sucedeu com as lamas da Fábrica 2, em que a utilização de um tempo de pré-hidrólise de 6 h permitiu que se obtivesse uma concentração de etanol semelhante com uma produtividade maior ao ensaio SSF normal. No entanto, a utilização de um tempo de 24 h não beneficiou as reações de sacarificação e fermentação.
- Avaliação da influência da percentagem de inóculo no SSF das lamas primárias da Fábrica 2, sem alterar o volume de trabalho: o aumento da percentagem de inóculo não teve influência na concentração máxima de etanol, mas a utilização de uma percentagem de inóculo de 19,6% favoreceu o processo SSF, na medida em que se obtiveram melhores produtividades.
- Avaliação de diferentes cargas enzimáticas no SSF das lamas primárias da Fábrica 2: não se verificaram diferenças significativas na concentração máxima de etanol na utilização das cargas enzimáticas de 15 FPU/g_{HC} e 10 FPU/g_H. A utilização de uma carga enzimática de 5 FPU/g_{HC} afetou negativamente a produção de etanol, verificando-se uma diminuição do rendimento e da produtividade. De forma a rentabilizar o processo os valores da carga enzimática podem ser otimizados para valores próximos de 10 FPU/g_H.
- Avaliação da eficiência do SSF das lamas primárias da Fábrica 2 (com 22% consistência) na “replicação” dos ensaios de Erlenmeyer para biorreatores em regime

descontínuo, utilizando como critérios de *scale-up* o número de Reynolds constante ou a velocidade periférica do agitador constante: verificou-se que o aumento de escala foi bem-sucedido, a concentração máxima de etanol foi semelhante, exceto para o VP.

- Avaliação da geometria de agitação nos biorreatores: a utilização de um *paddle* no VP favoreceu as condições de fermentação, resultando numa maior concentração de etanol. A utilização de uma vareta helicoidal no RA não favoreceu a produção de etanol, verificando-se uma diminuição significativa comparativamente com os ensaios de Erlenmeyer.
- Avaliação da velocidade de agitação nos ensaios VP e VG: verificou-se no ensaio VP_v e VG_v que a concentração de etanol obtida não foi a desejada, o mesmo não sucedeu no ensaio VG_A em que o seu rendimento foi superior a 70%. Os resultados obtidos em ambos os ensaios foram inferiores ao ensaio VG o que leva a concluir que a alteração de velocidade não foi bem-sucedida.

O trabalho experimental realizado confirmou que os objetivos inicialmente propostos foram alcançados: foi possível valorizar os resíduos lenho-celulósicos, conseguindo aumentar a concentração de etanol e replicar as condições de operação para uma escala maior. No entanto, será necessário realizar mais investigações neste tema. De seguida são apresentadas algumas sugestões de trabalho futuro:

- Realizar ensaios SSF em Erlenmeyer utilizando um *cocktail* de enzimas;
- Realizar um balanço mássico das reações SSF;
- Estudar o efeito da utilização de velocidades de agitação superiores ao utilizado neste trabalho;
- Realizar ensaios em biorreatores em semi-descontínuo com o objetivo de aumentar ainda mais a consistência;
- Realizar ensaios S-SSF com tempos de pré-hidrólise inferiores a 6 h para as lamas primárias da Fábrica 2;
- Realizar ensaios em balões de Erlenmeyer na qual se adiciona os nutrientes (forma aquosa) em spray;
- Realizar estudos de tixotropia no reómetro para as lamas primárias.

6. REFERÊNCIAS

1. *Trends in Global CO₂ Emissions: 2014 Report*. (2014). Acedido em: 09/08/2015, em: http://edgar.jrc.ec.europa.eu/news_docs/jrc-2014-trends-in-global-co2-emissions-2014-report-93171.pdf.
2. *Key World Energy Statistics*. (2014). Acedido em: 09/08/2015, em: <http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/keyworld2014.pdf>.
3. M. Balat. (2011). *Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: review*, *Energy Conversion and Management*, 52: 858-875.
4. A. Demirbas. (2008). *Biofuels sources, biofuel policy, biofuel economy and global biofuel projections*. *Energy Conversion and Management*, 49: 2106-2116.
5. *BP Statistical Review of World Energy*. (2014). Acedido em: 09/08/2015, em: <http://www.bp.com/content/dam/bp/pdf/Energy-economics/statistical-review-2014/BP-statistical-review-of-world-energy-2014-full-report.pdf>.
6. H. Shahsavarani, D. Hasegawa, D. Yokota, M. Sugiyama, Y. Kaneko, C. Boonchird, S. Harashima. (2013). *Enhanced bio-ethanol production from cellulosic materials by semi-simultaneous saccharification and fermentation using high temperature resistant *Saccharomyces cerevisiae* TJI4*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 115(1): 20-23.
7. S. N. Naik, V. V. Goud, P. K. Rout, A. K. Dalai. (2010). *Production of first and second generation biofuels: A comprehensive review*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14: 578-597.
8. A. K. Chandel, Chan ES, R. Rudravaram, M. L. Narasu, L. V. Rao, P. Ravindra. (2007). *Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal*. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 2: 014-032.
9. L. Kang, W. Wang, YY. Lee. (2010). *Bioconversion of Kraft Paper Mill Sludges to Ethanol by SSF and SSCF*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 161: 53-66.
10. J. Lu, X. Li, R. Yang, L. Yang, J. Zhao, Y. Liu, Y. Qu. (2013). *Fed-batch semi-simultaneous saccharification and fermentation of reed pretreated with liquid hot water for bio-ethanol production using *saccharomyces cerevisiae**. *Bioresource Technology*, 144: 539-547.
11. N. Okafor. (2007). *Modern industrial microbiology and Biotechnology*. 1ª Edição, Science Publishers.

12. M. M. Fonseca e J. A. Teixeira. (2007). *Reactores Biológicos – Fundamentos e Aplicações*. 1ª Edição, Lidel – Edições Técnicas Lda.
13. J. Nielsen e J. Villadsen. (2003). *Bioreactor Design and Scale-Up*. 2ª Edição, Kluwer Academic/Plenum Publishers, Nova Iorque.
14. B. Mcneil e L. M. Harvey. (2008). *Practical Fermentation Technology*. 2ª Edição, Taylor & Francis.
15. E. L. Paul, V. A. Atiemo-Obeng, S. M. Kresta. (2004). *HANDBOOK OF INDUSTRIAL MIXING SCIENCE AND PRACTICE*. 3ª Edição, A John Wiley & Sons, Inc., Nova Jérsea.
16. P. M. Doran. (1995). *Bioprocess engineering principles*. 1ª Edição, Elsevier.
17. J. Chaudhuri e M Al-Rubeai. (2005). *Bioreactors for Tissue Engineering: Principles, Design and Operation*. Springer.
18. F. Meuwly, PA. Ruffieux, A. Kadouri, U. Stockar. (2007). *Packed-bed bioreactors for mammalian cell culture: Bioprocess and biomedical applications*. *Biotechnology Advances*, 25(1): 45-56.
19. *Trickling Filters: Achieving Nitrification*. Acedido em: 11/08/2015, em http://www.nesc.wvu.edu/pdf/WW/publications/eti/TF_tech.pdf.
20. E. H. Eding, A. Kamstra, J. A. J. Verreth, E. A. Huisman, A. Klapwijk. (2006). *Design and operation of nitrifying trickling filters in recirculating aquaculture: A review*. *Aquacultural Engineering*, 34: 234-260.
21. M. Rüdüsüli, T. J. Schildhauer, S. M. A. Biollaz, J. R. Ommen. (2012). *Scale-up of bubbling fluidized bed reactors — A review*. *Powder Technology*, 217: 21-38.
22. K. S. K. R. Patnaik. (2010). *Fluidization Principles for Three-Phase Fluidized Bed Bio-Reactor*. *Internacional Journal of Chemical Engineering and Applications*, Vol. 1, No. 3.
23. S. Degaleesan, M. Dudukovic, Y. Pan. (2001). *Experimental Study of Gas-Induced Liquid-Flow Structures in Bubble Columns*. *Alche Journal*, 47(9): 1913-1931.
24. Y. T. Shah, B. G. Kelkar, S. P. Godbole, W. D. Deckwer. (1982). *Design parameters estimations for bubble column reactors*. *Alche Journal*, 28(3): 353-379.
25. G. D. Najafpour. (2007). *Biochemical Engineering and Biotechnology*. 1ª Edição, Elsevier.
26. B. N. Thorat e J. B. Joshi. (2003). *Regime transition in bubble columns: experimental and predictions*. *Experimental Thermal and Fluid Science*, 28: 423-430.

27. N. Kantarci, F. Borak, K. O. Ulgen. (2005). *Bubble column reactors (review)*. *Process Biochemistry*, 40: 2263-2283.
28. A. Prakash, A. Margaritis, H. Li, M. A. Bergougnou. (2001). *Hydrodynamics and local heat transfer measurements in a bubble column with suspension of yeast*. *Biochemical Engineering Journal*, 9(2): 155-163.
29. *Bubble Column reactor*. Acedido em: 20/06/2015, em: https://en.wikipedia.org/wiki/Bubble_column_reactor.
30. A. M. M. Martínez e E. M. E. Silva. (2013). *Airlift Bioreactors: Hydrodynamics and Rheology Application to Secondary Metabolites Production*. *Mass Transfer - Advances in Sustainable Energy and Environment Oriented Numerical Modeling*, Dr. Hironori Nakajima (Ed.), ISBN: 978-953-51-1170-2, InTech, DOI: 10.5772/53711. Acedido em: 02/06/2015, em: <http://www.intechopen.com/books/mass-transfer-advances-in-sustainable-energy-and-environment-oriented-numerical-modeling/airlift-bioreactors-hydrodynamics-and-rheology-application-to-secondary-metabolites-production>.
31. E. R. Donati e W. Sand. (2007). *Microbial Processing of Metal Sulfides*. 1ª Edição, Springer.
32. M. Y. Chisti e M. Moo-Young. (1987). *Airlift reactors: Characteristics, applications and design considerations*. *Chemical Engineering Communications*, Vol 60, pp. 195-242.
33. *Types of Bioreactor/Fermenter*. Acedido em: 15/06/2015, em: http://www.slideshare.net/ajithnandanam/types-of-bioreactors-fermenters?next_slideshow=1.
34. E. M. T. El-Mansi e C. F.A. Bryce. (1999). *Fermentation Microbiology and Biotechnology*. 2ª Edição, Taylor & Francis, Padstow.
35. J. A. Williams. *KEYS TO BIOREACTOR SELECTIONS*. Acedido em: 09/06/2015, em: <http://people.clarkson.edu/~wwilcox/Design/reactbio.pdf>.
36. H. C. Lim e H. S. Shin. (2013). *Fed-Batch Cultures: Principles and Applications of Semi-Batch Bioreactors*. 2ª Edição, Cambridge University Press.
37. J. Villadsen, J. Nielsen, G. Lidén. (2003). *Bioreaction Engineering principles*. 2ª Edição, Kluwer Academic/Plenum Publishers.
38. K. Riet e J. Tramper. (1991). *Basic Bioreactor Design*. 1ª Edição, Marcel Dekker, inc., Nova Iorque.

39. E. B. Stoker. (2011). *Comparative Studies on Scale-up Methods of Single-Use Bioreactors*. Thesis. Department Biological Engineering, Utah State University, Logan. 97pp.
40. D. J. Schell, J. D. McMillan, R. T. Elander, S. Viamajala. (2009). *Rheology of corn stover slurries at high solids concentrations – Effects of saccharification and particle size*. *Bioresource Technology*, 100: 925-934.
41. A. Pevere, G. Guibaud, E. Hullebusch, P. Lens, M. Baudu. (2006). *Viscosity evolution of anaerobic granular sludge*. *Biochemical Engineering*, 27: 315-322.
42. A. Barakat, B. Abu-Jdayil, N. Abunasser, S. Al-Asheh. (2002). *Rheological characteristics of microbial suspensions of Pseudomonas aeruginosa and Bacillus cereus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 30: 67-74.
43. I. Deniz, E. Imamoglu, F. V. Sukan. (2015). *Evaluation of scale-up parameters of bioethanol production from Escherichia coli KO11*. *Turkish Journal of Biochemistry*, 40(1): 74-80.
44. B. S. Dien, M. A. Cotta, T. W. Jeffries. (2003). *Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 63: 258-266.
45. M. Yanagisawa, K. Nakamura, O. Ariga, K. Nakasaki. (2011). *Production of high concentrations of bioethanol from seaweeds that contain easily hydrolyzable polysaccharides*. *Process Biochemistry*, 46: 2111-2116.
46. E. Imamoglu e F. V. Sukan. (2013). *Scale-up and kinetic modeling for bioethanol production*. *Bioresource Technology*, 144: 311-320.
47. H. Giese, W. Klöckner, C. Peña, E. Galindo, S. Lotter, K. Wetzels, L. Meissner, C. P. Peter, J. Büchs. (2014) *Effective shear rates in shake flasks*. *Chemical Engineering Science*, 118: 102-113.
48. P. G. Smith. (2011). *Introduction to food process Engineering*. 2ª Edição, Springer.

Anexos

Anexo I – Determinação da composição química dos materiais lenho-celulósicos

➤ Determinação da humidade/Sólidos Totais

A determinação da humidade/Sólidos Totais das lamas primárias foi realizada de acordo com o protocolo LAP-001: “Standard Method for determination of total Solids in Biomass”, efetuado pelo laboratório Nacional de Energia Renovável (National Renewable Energy Laboratory – NREL) (NREL – LAP001, 1994).

A determinação da humidade/Sólidos Totais foi realizado da seguinte forma:

- Coloca-se um pesa-filtros a secar numa estufa a 105°C durante cerca de 3 h. Retira-se para um exsiccador e deixa-se arrefecer, posteriormente regista-se o seu peso até valor constante;
- Coloca-se uma quantidade de amostra do material (≈ 5 g), colocando no pesa-filtros e regista-se o seu peso. Cada amostra deve ser realizada no mínimo em duplicado;
- Coloca-se a amostra numa estufa a 105 °C durante a noite;
- Retira-se para um exsiccador, deixa-se arrefecer e regista-se o seu peso.

O cálculo da humidade e da quantidade de sólidos totais é calculado através das seguintes equações.

$$\text{Sólidos Totais (\%)} = \frac{[\text{Pesafiltros e Amostra Seca}] - [\text{Pesafiltros}]}{\text{Amostra húmida}} \times 100 \quad \text{Equação 23}$$

$$\text{Humidade (\%)} = \left(1 - \frac{[\text{Pesafiltros e Amostra Seca}] - [\text{Pesafiltros}]}{\text{Amostra húmida}} \right) \times 100 \quad \text{Equação 24}$$

➤ Matéria inorgânica (cinzas)

A matéria inorgânica (teor de cinzas) é determinado seguindo o protocolo LAP-005: “Standard Method for Ash in Biomass”, efetuado pelo NREL (NREL-LAP 005, 1994). A sua determinação foi calculado através seguintes passos:

- Coloca-se um cadinho de porcelana numa mufla a 575°C durante cerca de 3 h, retira-se para um exsiccador, deixa-se arrefecer e regista-se o seu peso;

- Pesa-se certa de 1g de amostra seca a 105°C e coloca-se no cadinho de porcelana;
- Leva-se o cadinho com a amostra à mufla para incineração a 575 °C, durante a noite;
- Retira-se o cadinho para um exsiccador, deixa-se arrefecer e regista-se o seu peso;

O cálculo do teor de cinzas é dado pela equação 25:

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{[\text{Cadinho e Cinzas } 575^{\circ}\text{C}] - [\text{Cadinho}]}{\text{Amostra seca } 105^{\circ}\text{C}} \times 100 \quad \text{Equação 25}$$

➤ Carbonato de Cálcio

A quantidade de Carbonato de Cálcio (CaCO₃) é calculada da seguinte forma:

- Leva-se à mufla o cadinho com as cinzas 575 °C para incineração a 900 °C, durante a noite;
- Retira-se o cadinho para um exsiccador, deixa-se arrefecer e regista-se o seu peso.

A quantidade de CaCO₃ é calculado através da equação 26:

$$\text{CaCO}_3 (\%) = \frac{([\text{Cadinho e Cinzas } 575^{\circ}\text{C}] - [\text{Cadinho e Cinzas } 900^{\circ}\text{C}]) \times \frac{100,1}{44,1}}{\text{Amostra seca } 105^{\circ}\text{C}} \times 100 \quad \text{Equação 26}$$

A diferença entre as cinzas a 575 °C e as cinzas a 900 °C indica a quantidade de CO₂ libertada. A quantidade de CaCO₃ existente na amostra é determinada de acordo com a relação estequiométrica.

$$\text{CaCO}_3 = \text{CO}_2 \times \frac{100,1}{44,1} \quad \text{Equação 27}$$

➤ Matéria orgânica

A matéria orgânica é calculada através da diferença entre a massa seca pesada inicialmente e a massa de cinzas resultante da incineração a 575 °C.

$$\text{Matéria Orgânica (\%)} = \frac{\text{Amostra seca } 105^{\circ}\text{C} - ([\text{Cadinho e Cinzas } 575^{\circ}\text{C}] - [\text{Cadinho}])}{\text{Amostra seca } 105^{\circ}\text{C}} \times 100$$

Equação
28

➤ Determinação da lenhina total (lenhina solúvel e insolúvel)

A lenhina solúvel e insolúvel presente nas lamas primárias é determinado segundo os protocolos LAP-004: “*Determination of Acid-Soluble Lignin in Biomass*” e LAP-003: “*Determination of Acid-Insoluble Lignin in Biomass*”, respetivamente. Foram realizados pelo laboratório NREL (NREL-LAP 003, 1995; NREL-LAP 004, 1996). A sua determinação é efectuada através dos seguintes passos:

- Coloca-se um cadinho filtrante e um filtro de fibra de vidro a secar na estufa a 105 °C durante cerca de 3 h;
- Retira-se para um exsiccador, deixa-se arrefecer e regista-se o seu peso. Coloca-se o filtro no cadinho filtrante;
- Pesar aproximadamente 0,3 g de amostra, coloca-se num tubo de ensaio e regista-se o seu peso;
- Adiciona-se ao tubo de ensaio 3 mL de H₂SO₄ a 72% m/m e mistura-se durante 1 minuto;
- Coloca-se o tubo de ensaio num banho a 30 °C durante 2 horas e agita-se a cada 15 minutos;
- Ao fim das duas horas, dilui-se o hidrolisado com água destilada até perfazer uma concentração de H₂SO₄ de 4% m/m;
- Leva-se à autoclave, a uma temperatura de 121 °C durante 60 minutos;
- Deixa-se arrefecer e filtra-se a vácuo o hidrolisado resultante através do cadinho com o filtro;
- Decanta-se uma pequena amostra do sobrenadante e guarda-se para mais tarde determinar a lenhina solúvel;
- Lava-se o resíduo sólido resultante da filtração com água destilada quente;

- O cadinho filtrante, juntamente com o resíduo insolúvel, é levado a secar à estufa a 105 °C durante a noite;
- Retira-se para um exsiccador, deixa-se arrefecer e regista-se o seu peso;
- Retira-se com cuidado o filtro de fibra juntamente com o resíduo e coloca-se num cadinho de porcelana (previamente pesado depois de levado à mufla a 575 °C durante 3h). Coloca-se na mufla a 575 °C durante a noite;
- Retira-se o cadinho para um exsiccador, deixa-se arrefecer e regista-se o seu peso.

A quantidade de lenhina insolúvel é determinado através da equação 29:

$$\text{Lenhina insolúvel (\%)} = \frac{([\text{Cadinho e Resíduo}] - [\text{Cadinho e Cinzas } 575^{\circ}\text{C}])}{\text{Amostra seca}} \times 100 \quad \text{Equação 29}$$

A lenhina solúvel é determinada através da leitura da absorvância (Abs) da amostra do sobrenadante resultante. A amostra tem de ser previamente diluída de modo que a leitura da absorvância resultante esteja entre 0,2 e 0,7. Utiliza-se um espectrofotómetro Vis-UV com um comprimento de onda de 205 nm, usando como branco uma amostra de H₂SO₄ a 4% m/m. A quantidade de lenhina solúvel é calculado através da equação 30:

$$\text{Lenhina solúvel (\%)} = \frac{\frac{\text{Abs}}{110 \left(\frac{\text{g}}{\text{L}}\right)} \times \text{Factor diluição} \times 0,87 \text{ L}}{\text{Amostra seca } 105^{\circ}\text{C (g)}} \times 100 \quad \text{Equação 30}$$

$$\text{Lenhina Total (\%)} = \text{Lenhina insolúvel (\%)} + \text{Lenhina Solúvel (\%)} \quad \text{Equação 31}$$

➤ Determinação dos hidratos de carbono

A quantidade percentual de hidratos de carbono é calculada pela diferença entre a matéria orgânica e a lenhina total, como mostra a equação 32:

$$\text{Hidratos de carbono (\%)} = \text{Matéria Orgânica (\%)} - \text{Lenhina Total (\%)} \quad \text{Equação 32}$$

Anexo II – Caracterização do extrato enzimático

➤ Atividade enzimática

A determinação da atividade enzimática dos extratos enzimáticos seguiram o protocolo LAP-006: “*Measurement of Cellulase Activities*” (NREL-LAP 006,1996).

A determinação da atividade enzimática foi realizado da seguinte forma:

- Recorta-se tiras de papel de filtro com largura 1,0 cm e um comprimento de 6,0 cm;
- Preparam-se varias soluções diluídas das enzimas selecionadas. A diluição da solução original é efetuada com tampão citrato 0,05 M. Tem-se assim diferentes concentrações volumétricas (mL enzima/mL amostra diluída) de solução de enzima;
- Adicionam-se 0,5 mL de cada concentração enzimática preparada a 1mL de tampão citrato 0,05 M num tubo de ensaio. Coloca-se na incubadora a 38 °C por alguns minutos;
- Após uns minutos na incubadora adiciona-se a tira de papel de filtro e incuba-se a 38 °C durante 60 minutos;
- Ao fim de 60 minutos adiciona-se 3,0 mL de reagente DNS e coloca-se num banho a ferver, durante 5 min. Logo de seguida, adiciona-se a um banho gelado e deixa-se a repousar por mais 5 minutos;
- Pipeta-se 0,2 mL de amostra para uma cuvete e adiciona-se 2,5 mL de água destilada;
- Efetua-se a leitura num espetrofotómetro a 540nm de todas as amostras contra um branco de tampão citrato;
- Utiliza-se a equação da curva de calibração da glucose anteriormente preparada com soluções de glucose de concentração conhecida, para se poder determinar a concentração de glucose libertada pela tira de papel;
- Identificam-se quais as duas concentrações de enzima que libertaram cerca de 2 mg de glucose, um valor a cima e outro a baixo, de seguida efetuou-se uma interpolação linear entre estes dois pontos e determina-se a concentração de enzima que liberta apenas 2 mg de glucose.

- O valor da concentração da enzima é utilizado para calcular a atividade enzimática (FPU/mL de enzima), através da equação 33.

$$FPU = \frac{0,37}{[enzima]}$$

Equação 33

Anexo III – Quantidades utilizadas nos ensaios de Erlenmeyer

Tabela 23: Representação das quantidades utilizadas em cada ensaio, assim como a concentração de hidratos de carbono (g/L) para cada ensaio.

Quantidades utilizadas		Consistênci a (%)	Hidratos de Carbono (g/L)
Lamas da Fábrica 1			
A	27 g lamas húmidas 20 mL sol enzima (1 mL enzima+19 mL tampão): 15 FPU/gHC 10 mL sol extractos (3 g/L ext malte, 3 g/L ext levedura, 5 g/L peptona) 10 mL inóculo 33 mL tampão 100 mL Total	6,2	50
B	27 g lamas húmidas 10 mL sol enzima (1 mL enzima+9 mL tampão): 15 FPU/gHC 5 mL sol extractos (3 g/L ext malte, 3 g/L ext levedura, 5 g/L peptona) 10 mL inóculo 52 mL Total	11,86	96
C	54 g lamas húmidas 10 mL sol enzima (1,6 mL enzima+8,4 mL tampão): 15 FPU/gHC 5 mL sol extractos (3 g/L ext malte, 3 g/L ext levedura, 5 g/L peptona) 10 mL inóculo 79 mL Total	15,61	126
Lamas da Fábrica 2			
A	16,1 g lamas húmidas 20 mL sol enzima (1 mL enzima+19 mL tampão): 15 FPU/gHC 10 mL sol extractos (3 g/L ext malte, 3 g/L ext levedura, 5 g/L peptona) 10 mL inóculo 43,9 mL tampão 100 mL Total	8	50
B	16,1 g lamas húmidas 10 mL sol enzima (1 mL enzima+9 mL tampão): 15 FPU/gHC 5 mL sol extractos (3 g/L ext malte, 3 g/L ext levedura, 5 g/L peptona) 10 mL inóculo 10 mL tampão 51,1 mL Total	15,8	97,8
C	32,2 g lamas húmidas 10 mL sol enzima (1,6 mL enzima+8,4 mL tampão): 15 FPU/gHC 5 mL sol extractos (3 g/L ext malte, 3 g/L ext levedura, 5 g/L peptona) 10 mL inóculo 57,2 mL Total	28	174,5
D	25,08 g lamas húmidas 10 mL sol enzima (2,6mL enzima+7,4 mL tampão): 15 FPU/gHC 13,02 mL sol nutrientes (3 g/L ext levedura, 5 g/L peptona) 8,9 mL inóculo 57 mL Total	22	136,4

Anexo IV – Quantificação de compostos por HPLC e respetivos tempos de retenção

O método HPLC consiste numa técnica analítica que tem como objetivo identificar e quantificar as diversas moléculas presentes na amostra, através do seu tempo de retenção. A sua identificação e quantificação ocorre através de um detetor, na qual o eluente que arrasta consigo a amostra atravessa o detetor e há uma alteração do índice de refração. Antes de iniciar a deteção dos compostos é necessário construir as curvas de calibração. As curvas de calibração são construídas através de sucessivas injeções no HPLC de soluções padrão com o composto que se pretende estudar com diferentes concentrações.

As equações que descrevem as curvas de calibração são equações lineares que passam pela origem ($b=0$), em que:

$$y = m \cdot x \quad \text{Equação 34}$$

Em que:

y – resposta á passagem do composto pelo detetor, mRIU.s;

x – concentração do composto em estudo, mg/mL;

m – declive da reta.

A tabela 24 descreve os tempos de retenção, declive da reta e o respetivo fator de correlação para os compostos estudados ao longo do trabalho por HPLC.

Tabela 24: Tempo de retenção, declive da reta e o respetivo fator de correlação para os compostos analisados por HPLC.

Nome do composto	Tempo de retenção (min)	m	r²
Glucose	13,293	0,35292	0,997
Xilose	14,477	0,35526	0,997
Glicerol	19,527	0,26396	0,999
Etanol	20,113	0,15793	0,999
Xilitol	26,090	0,27511	0,999

Anexo V – Concentração de subprodutos

Na tabela 25 encontram-se os valores correspondentes a concentração de etanol, xilitol e glicerol para o ensaio A da LP1, retirado do HPLC.

Tabela 25: Valores obtidos para o ensaio A da LP1, retirado do HPLC.

LP1	tempo (h)	[EtOH] (g/L)	[Xilitol] (g/L)	[Glicerol] (g/L)
Ensaio A	3	2,31	0	0,16
	6	4,84	0	0,66
	24	18,02	2,91	1,06
	30	18,83	3,92	1,10
	48	16,03	6,84	0,25
	54	15,17	7,62	0
	72	14,69	8,20	0
	78	14,06	8,45	0

Anexo VI – Reologia

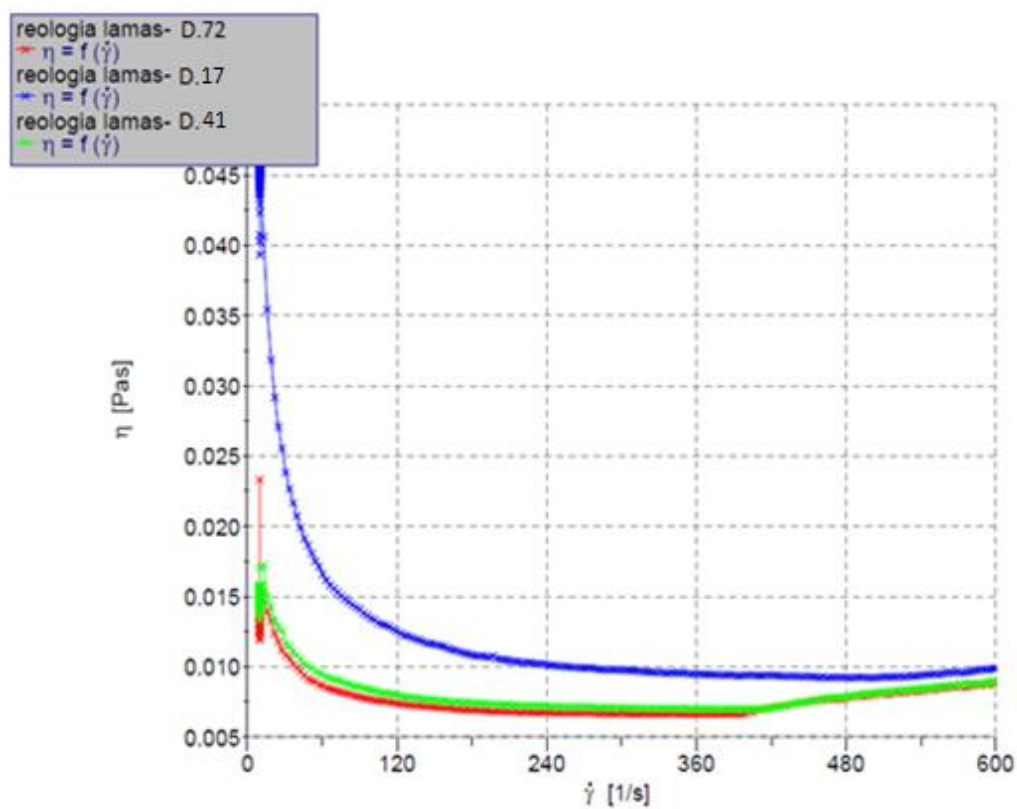


Figura 22: Perfil da viscosidade aparente em função da velocidade de corte para o ensaio D das LP2.

Anexo VII – Valores fornecidos pelo reómetro para a viscosidade aparente em função da velocidade de corte

Tabela 26: Valores fornecidos pelo reómetro para a viscosidade aparente em função da velocidade de corte para os ensaios D.17, D.41. e D.72.

D.17		D.41		D.72	
γ (s ⁻¹)	η (Pa.s)	γ (s ⁻¹)	η (Pa.s)	γ (s ⁻¹)	η (Pa.s)
10,00	0,043600	10,02	0,017000	10,03	0,015700
12,94	0,040580	12,94	0,017200	12,97	0,015300
15,95	0,035410	15,95	0,015000	15,97	0,013890
18,96	0,031840	18,89	0,014290	18,98	0,013210
21,89	0,029180	21,90	0,013290	21,84	0,012330
24,90	0,027070	24,83	0,012810	24,85	0,011770
27,76	0,025520	27,84	0,012530	27,78	0,011140
30,77	0,023820	30,77	0,011610	30,79	0,010790
33,70	0,022640	33,78	0,011440	33,80	0,010590
36,71	0,021650	36,72	0,011080	36,74	0,010140
39,64	0,020700	39,65	0,010790	39,74	0,009919
42,65	0,019870	42,66	0,010520	42,68	0,009668
45,66	0,019110	45,59	0,010170	45,61	0,009369
48,60	0,018630	48,60	0,010060	48,55	0,009121
51,61	0,018050	51,54	0,009874	51,56	0,008981
54,47	0,017500	54,55	0,009661	54,49	0,008909
57,48	0,017110	57,48	0,009531	57,43	0,008678
60,41	0,016570	60,42	0,009429	60,44	0,008649
63,35	0,016140	63,36	0,009272	63,45	0,008471
66,36	0,015790	66,37	0,009160	66,39	0,008403
69,37	0,015530	69,38	0,009078	69,40	0,008317
72,31	0,015290	72,31	0,009012	72,33	0,008217
75,32	0,015020	75,25	0,008949	75,34	0,008180
78,18	0,014780	78,26	0,008800	78,28	0,008075
81,19	0,014590	81,20	0,008762	81,22	0,008062
84,13	0,014400	84,21	0,008626	84,23	0,007945
87,14	0,014220	87,14	0,008565	87,16	0,007866
90,15	0,014060	90,16	0,008559	90,10	0,007831
93,09	0,013790	93,09	0,008432	93,04	0,007762
96,10	0,013630	96,03	0,008388	96,05	0,007678

D.17	
γ (s ⁻¹)	η (Pa.s)
99,03	0,013420
102,00	0,013320
104,90	0,013100
107,90	0,013000
110,90	0,012940
113,90	0,012820
116,90	0,012650
119,70	0,012510
122,70	0,012360
125,80	0,012220
128,70	0,012170
131,70	0,012070
134,60	0,011940
137,60	0,011880
140,50	0,011790
143,50	0,011670
146,50	0,011630
149,50	0,011580
152,40	0,011520
155,40	0,011460
158,40	0,011400
161,30	0,011260
164,30	0,011160
167,30	0,011140
170,20	0,011050
173,20	0,010950
176,10	0,010910
179,10	0,010830
182,10	0,010770
185,10	0,010760
188,00	0,010750
191,00	0,010680
194,00	0,010640
196,90	0,010740
199,90	0,010560
202,90	0,010510
205,80	0,010470

D.41	
γ (s ⁻¹)	η (Pa.s)
98,96	0,008318
102,00	0,008269
105,00	0,008180
107,90	0,008124
110,90	0,008115
113,90	0,008069
116,90	0,008018
119,70	0,007966
122,80	0,007899
125,80	0,007828
128,60	0,007793
131,60	0,007806
134,60	0,007744
137,60	0,007732
140,60	0,007684
143,50	0,007667
146,50	0,007643
149,50	0,007629
152,40	0,007595
155,40	0,007560
158,40	0,007562
161,40	0,007503
164,30	0,007459
167,30	0,007496
170,20	0,007481
173,20	0,007423
176,10	0,007450
179,10	0,007398
182,10	0,007389
185,10	0,007377
188,00	0,007361
191,00	0,007356
194,00	0,007321
197,00	0,007318
199,90	0,007297
202,80	0,007282
205,80	0,007272

D.72	
γ (s ⁻¹)	η (Pa.s)
99,06	0,007659
102,00	0,007578
104,90	0,007558
107,90	0,007538
110,90	0,007512
113,90	0,007447
116,80	0,007416
119,80	0,007387
122,80	0,007348
125,70	0,007310
128,70	0,007260
131,70	0,007251
134,70	0,007207
137,60	0,007205
140,50	0,007161
143,50	0,007133
146,50	0,007126
149,50	0,007088
152,40	0,007075
155,40	0,007042
158,30	0,007036
161,30	0,007033
164,30	0,006983
167,30	0,006948
170,30	0,006958
173,20	0,006899
176,10	0,006918
179,20	0,006865
182,10	0,006902
185,10	0,006879
188,00	0,006860
191,00	0,006832
194,00	0,006815
196,90	0,006798
199,90	0,006807
202,90	0,006795
205,80	0,006772

Bioconversão integrada de lamas celulósicas em etanol: alterações processuais para o aumento da produtividade

D.17	
γ (s ⁻¹)	η (Pa.s)
208,80	0,010450
211,70	0,010370
214,70	0,010350
217,70	0,010330
220,70	0,010270
223,60	0,010280
226,60	0,010260
229,60	0,010230
232,50	0,010200
235,50	0,010190
238,40	0,010170
241,50	0,010090
244,40	0,010080
247,40	0,010060
250,30	0,010010
253,30	0,010020
256,20	0,009968
259,20	0,009954
262,20	0,009924
265,20	0,009919
268,20	0,009897
271,10	0,009879
274,00	0,009884
277,00	0,009880
280,00	0,009810
282,90	0,009775
285,90	0,009796
288,90	0,009747
291,90	0,009787
294,80	0,009770
297,80	0,009751
300,80	0,009734
303,70	0,009721
306,70	0,009723
309,60	0,009689
312,70	0,009689
315,60	0,009658

D.41	
γ (s ⁻¹)	η (Pa.s)
208,80	0,007274
211,70	0,007231
214,70	0,007250
217,70	0,007227
220,70	0,007188
223,60	0,007207
226,60	0,007210
229,60	0,007210
232,50	0,007184
235,50	0,007187
238,40	0,007194
241,40	0,007176
244,40	0,007138
247,30	0,007153
250,30	0,007128
253,30	0,007138
256,20	0,007112
259,20	0,007117
262,20	0,007115
265,20	0,007122
268,20	0,007112
271,10	0,007123
274,10	0,007116
277,00	0,007102
280,00	0,007065
282,90	0,007059
285,90	0,007090
288,90	0,007040
291,90	0,007093
294,80	0,007046
297,80	0,007038
300,80	0,007083
303,70	0,007059
306,70	0,007059
309,70	0,007037
312,70	0,007043
315,60	0,007035

D.72	
γ (s ⁻¹)	η (Pa.s)
208,70	0,006794
211,70	0,006756
214,80	0,006774
217,70	0,006718
220,70	0,006744
223,60	0,006768
226,60	0,006732
229,60	0,006724
232,50	0,006702
235,50	0,006724
238,50	0,006724
241,40	0,006737
244,40	0,006702
247,40	0,006689
250,40	0,006694
253,30	0,006684
256,20	0,006681
259,20	0,006694
262,30	0,006685
265,20	0,006677
268,10	0,006673
271,10	0,006681
274,10	0,006673
277,00	0,006687
280,00	0,006653
283,00	0,006635
285,90	0,006652
288,90	0,006628
291,80	0,006640
294,80	0,006611
297,80	0,006657
300,80	0,006656
303,70	0,006628
306,70	0,006625
309,70	0,006615
312,60	0,006617
315,60	0,006628

D.17	
γ (s ⁻¹)	η (Pa.s)
318,50	0,009628
321,50	0,009618
324,60	0,009603
327,40	0,009571
330,40	0,009572
333,40	0,009557
336,40	0,009518
339,30	0,009546
342,30	0,009537
345,30	0,009543
348,30	0,009518
351,20	0,009534
354,20	0,009453
357,10	0,009448
360,10	0,009453
363,00	0,009456
366,00	0,009430
369,00	0,009443
372,00	0,009407
374,90	0,009413
377,90	0,009390
380,90	0,009382
383,80	0,009408
386,80	0,009403
389,70	0,009392
392,80	0,009334
395,70	0,009328
398,70	0,009378
401,70	0,009373
404,70	0,009389
407,70	0,009349
410,60	0,009344
413,60	0,009341
416,60	0,009381
419,50	0,009360
422,60	0,009363
425,60	0,009333

D.41	
γ (s ⁻¹)	η (Pa.s)
318,50	0,007024
321,50	0,007032
324,50	0,007025
327,50	0,007025
330,40	0,007025
333,40	0,007034
336,40	0,006992
339,30	0,007024
342,30	0,007022
345,30	0,007018
348,30	0,007017
351,20	0,007015
354,20	0,006985
357,20	0,006968
360,10	0,006966
363,00	0,006991
366,00	0,006969
369,00	0,006991
372,00	0,006973
374,90	0,006969
377,90	0,006962
380,90	0,006960
383,80	0,006976
386,80	0,006969
389,70	0,006973
392,80	0,006956
395,80	0,006974
398,60	0,006961
401,70	0,006983
404,60	0,006958
407,70	0,006974
410,70	0,006990
413,60	0,006951
416,70	0,006958
419,60	0,007040
422,60	0,007100
425,50	0,007124

D.72	
γ (s ⁻¹)	η (Pa.s)
318,60	0,006630
321,60	0,006630
324,50	0,006634
327,40	0,006616
330,40	0,006626
333,40	0,006593
336,30	0,006631
339,30	0,006645
342,30	0,006642
345,30	0,006608
348,30	0,006621
351,20	0,006617
354,20	0,006613
357,20	0,006607
360,10	0,006586
363,00	0,006601
366,10	0,006590
369,00	0,006593
372,00	0,006588
374,90	0,006597
377,90	0,006605
380,90	0,006614
383,80	0,006620
386,80	0,006624
389,80	0,006620
392,80	0,006614
395,70	0,006612
398,70	0,006655
401,70	0,006777
404,70	0,006784
407,70	0,006893
410,70	0,006940
413,60	0,006966
416,60	0,007039
419,60	0,007076
422,60	0,007123
425,60	0,007161

Bioconversão integrada de lamas celulósicas em etanol: alterações processuais para o aumento da produtividade

D.17	
γ (s ⁻¹)	η (Pa.s)
428,60	0,009319
431,50	0,009292
434,50	0,009295
437,50	0,009307
440,50	0,009295
443,40	0,009293
446,40	0,009273
449,40	0,009303
452,40	0,009281
455,40	0,009247
458,40	0,009217
461,40	0,009257
464,40	0,009194
467,40	0,009210
470,40	0,009217
473,30	0,009225
476,40	0,009207
479,20	0,009231
482,30	0,009197
485,30	0,009182
488,20	0,009222
491,20	0,009224
494,20	0,009223
497,30	0,009189
500,20	0,009180
503,20	0,009201
506,10	0,009207
509,10	0,009255
512,10	0,009257
515,10	0,009250
518,10	0,009272
521,00	0,009256
524,10	0,009282
527,10	0,009257
530,10	0,009315
533,10	0,009313
536,00	0,009312

D.41	
γ (s ⁻¹)	η (Pa.s)
428,60	0,007170
431,50	0,007216
434,50	0,007259
437,50	0,007325
440,50	0,007372
443,50	0,007413
446,40	0,007455
449,50	0,007481
452,50	0,007574
455,40	0,007562
458,40	0,007604
461,40	0,007701
464,30	0,007761
467,30	0,007762
470,30	0,007774
473,30	0,007819
476,40	0,007815
479,30	0,007841
482,30	0,007896
485,30	0,007900
488,20	0,007968
491,20	0,008031
494,20	0,008048
497,20	0,008079
500,20	0,008055
503,20	0,008119
506,20	0,008160
509,10	0,008141
512,10	0,008215
515,10	0,008232
518,10	0,008187
521,00	0,008367
524,10	0,008246
527,00	0,008347
530,10	0,008304
533,10	0,008366
536,00	0,008393

D.72	
γ (s ⁻¹)	η (Pa.s)
428,50	0,007188
431,50	0,007196
434,50	0,007263
437,50	0,007341
440,50	0,007406
443,50	0,007438
446,50	0,007446
449,40	0,007510
452,40	0,007506
455,40	0,007595
458,30	0,007609
461,40	0,007602
464,30	0,007662
467,40	0,007698
470,30	0,007628
473,30	0,007681
476,30	0,007669
479,30	0,007743
482,30	0,007792
485,20	0,007801
488,30	0,007924
491,30	0,007870
494,20	0,007863
497,20	0,007932
500,20	0,007977
503,20	0,007969
506,10	0,008063
509,20	0,008097
512,20	0,008009
515,10	0,008036
518,10	0,008125
521,10	0,008154
524,00	0,008131
527,10	0,008114
530,00	0,008252
533,00	0,008216
536,10	0,008272

D.17	
γ (s ⁻¹)	η (Pa.s)
539,00	0,009363
541,90	0,009389
545,00	0,009418
547,90	0,009418
551,00	0,009467
553,90	0,009429
556,90	0,009470
559,90	0,009518
562,90	0,009569
565,90	0,009547
568,90	0,009618
571,8	0,009549
574,8	0,009559
577,8	0,00961
580,8	0,00965
583,8	0,009705
586,7	0,00973
589,7	0,009799
592,8	0,009779
595,7	0,009807
598,7	0,009807
600	0,009863

D.41	
γ (s ⁻¹)	η (Pa.s)
539,00	0,008409
541,90	0,008463
545,00	0,008420
547,90	0,008480
551,00	0,008500
553,90	0,008567
556,90	0,008538
559,90	0,008631
562,90	0,008542
565,90	0,008696
568,80	0,008571
571,90	0,008725
574,80	0,008805
577,80	0,008759
580,70	0,008798
583,80	0,008721
586,70	0,008778
589,70	0,008791
592,80	0,008851
595,70	0,008908
598,70	0,008940
600,00	0,008877

D.72	
γ (s ⁻¹)	η (Pa.s)
539,00	0,008216
542,00	0,008258
544,90	0,008394
547,90	0,008365
550,90	0,008334
553,90	0,008438
557,00	0,008449
559,90	0,008465
562,90	0,008474
565,80	0,008531
568,90	0,008538
571,80	0,008593
574,80	0,008491
577,90	0,008571
580,80	0,008667
583,80	0,008656
586,70	0,008652
589,70	0,008743
592,80	0,008710
595,70	0,008793
598,70	0,008805
600,00	0,008726

Anexo VIII – Quantidades utilizadas nos ensaios de *scale-up*

Tabela 27: Representação das quantidades e condições utilizadas em cada ensaio.

Quantidades utilizadas		Ensaio	Geometria e velocidade de agitação
Consistência: 22%			
VP-1.1L	209,4 g lamas húmidas	VP	Hélice 4pás:200 rpm
	100 mL sol enzima (13,4mL enzima+87 mL tampão): 15 FPU/gHC		
	93 mL sol nutrientes (3 g/L ext levedura, 5 g/L peptona)	VP _p	Paddle:200 rpm
	74 mL inóculo		
476,4 mL Total	VP _v	Hélice 4pás:200/100 rpm	
VG-3.4L	620 g lamas húmidas	VG	Hélice 4pás:100 rpm
	100 mL sol enzima (39,77 mL enzima+60,23 mL tampão): 15 FPU/gHC		
	472 mL sol nutrientes (3 g/L ext levedura, 5 g/L peptona)	VG _A	Hélice 4pás:200 rpm
	219 mL inóculo		
1411 mL Total	VG _v	Hélice 4pás:200/100 rpm	
RA	440 g lamas húmidas	RA	Hélice:200 rpm
	100 mL sol enzima (28,2 mL enzima+71,8 mL tampão): 15 FPU/gHC		
	305 mL sol nutrientes (3 g/L ext levedura, 5 g/L peptona)		
	155 mL inóculo		
1000 mL Total			
Bi-5L	1100 g lamas húmidas	Bi	Rushton:180 rpm
	100 mL sol enzima (29,4 mL enzima+70,6 mL tampão): 15 FPU/gHC		
	912,5 mL sol nutrientes (3 g/L ext levedura, 5 g/L peptona)		
	387,5 mL inóculo		
2500 mL Total			