

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

**PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE XILITOL E ETANOL A PARTIR DE
HIDROLISADO DE CASCA DE SOJA**

Ângela Cristina Schirmer Michel

Porto Alegre

2007

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

**PRODUÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE XILITOL E ETANOL A PARTIR DE
HIDROLISADO DE CASCA DE SOJA**

Ângela Cristina Schirmer Michel
Engenheiro de Alimentos - UFRGS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos como um dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Marco Antônio Záchia Ayub

Co-orientador: Simone Hickmann Flôres

Porto Alegre

2007

CIP - CATALOGAÇÃO INTERNACIONAL NA PUBLICAÇÃO

M623p Michel, Ângela Cristina Schirmer

Produção biotecnológica de xilitol e etanol a partir de hidrolisado de casca de soja./ Ângela Cristina Schirmer Michel. – Porto Alegre: UFRGS, 2007.

75f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, BR-RS, 2007. Marco Antônio Záchia Ayub, Orient.; Simone Hickmann Flôres, Co-orient.

1. Casca de soja 2. *Candida guilliermondii* 3. Hidrolisado 4. Etanol 5.Xilitol. I. Ayub, Marco Antônio Záchia, Orient. II. Flores, Simone Hickmann, Co-orient. III. Título.

CDU: 664:633.34

Ângela Cristina Schirmer Michel
Engenheiro de Alimentos - UFRGS

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS, Brasil.

Aprovada em: 28/02/2007
Pela Banca Examinadora:

Homologada em: 04/04/2007
Por:

Marco Antônio Záchia Ayub
Orientador – PPGCTA/UFRGS

Erna Vogt de Jong
Coordenador do Programa de Pós
Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos (PPGCTA)

Simone Hickamnn Flôres
Co-orientador – UFRGS

Jeverson Frazzon
Banca – UFRGS

Rosane Rech
Banca – UFRGS

Adriano Brandeli
Diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia
de Alimentos. ICTA/UFRGS

Júlio Xandro Heck
Banca – Escola Técnica UFRGS

AGRADECIMENTOS

Ao professor Marco Antônio Záchia Ayub, por ter me ensinado, em meus momentos de angústia, que a negação de uma hipótese pode ser a revelação de belos achados científicos. Por toda dedicação e atenção despendidas à realização do presente trabalho, mas principalmente, pela paciência com que me orientou ao longo desses dois anos. Muito obrigada por todo o aprendizado.

À professora Simone Hickmann Flores pela orientação e amizade. Pela disposição, dedicação e rapidez que sempre demonstrou no atendimento de minhas necessidades. Pelas conversas e conselhos que tornaram essa etapa mais suave e agradável.

Ao Professor Plinho Francisco Hertz pelas orientações e inúmeras contribuições. Pela sua sempre pronta disposição para esclarecimento de dúvidas, não importando hora ou local. Por permitir que seu laboratório se tornasse o ponto de encontro das mestrandas para o café e conversas que deixaram muitas saudades. Obrigada por tudo.

Ao Gilvane de Souza Matos por todo o seu conhecimento sobre xilitol, adquiridos ao longo de toda a sua pós-graduação, sempre prontamente compartilhados comigo. Por sua ajuda nas inúmeras etapas de obtenção do hidrolisado. Por providenciar soluções práticas aos obstáculos encontrados.

À professora Rosane, por ter cedido, prontamente seu laboratório e equipamentos indispensáveis à realização desse trabalho. Por todas as conversas e esclarecimentos de dúvidas. Sou profundamente grata a ela.

À professora Erna Vogt de Jong pela figura maternal que sempre representou. Por seu beijo todo dia pela manhã. Por suas palavras doces e de incentivo. Por tornar essa etapa de finalização mais fácil e tranquila.

Aos colegas de laboratório pela colaboração sempre pronta de todos. Pelos momentos de descontração proporcionados, os quais tornavam resultados péssimos motivos de riso. Pelo coleguismo sem o qual, com certeza, não realizaríamos os nossos trabalhos.

Aos amigos Cláucia Volken de Souza e Júlio Xandro Heck por toda a amizade, companheirismo e, principalmente, por dividirem comigo toda a sua experiência, ajudando-me na bancada de trabalho no dia-a-dia do laboratório.

Às minhas pupilas, Aline e Nilvane, sem a ajuda das quais esse trabalho seria impossível. Pelo companheirismo, amizade e, principalmente, paciência de vocês nas

inúmeras e demoradas operações unitárias de nosso trabalho. Agradeço pelos momentos de descontração e alegria que passamos juntas.

Às novas amigas Débora e Flávia, pela oportunidade de tê-las conhecido. Por todos os momentos que passamos juntas, os ótimos e nem tão bons assim. Por toda ajuda prestada sem a qual esse trabalho se tornaria mais difícil. Pelas colaborações psicológicas e concretas. Por todas as determinações de k_L ; pelas madrugadas juntas no ICTA; pelos cafés; pelas crises de risos, por dividirmos nossos sonhos e angústias. Enfim, muito obrigada pela linda amizade de vocês.

Ao Anderson, meu marido e fiel companheiro, para qual me faltam palavras de agradecimento. Pela paciência, dedicação e companheirismo. Por ter compartilhado comigo meus anseios e angústias. Pelas noites e madrugadas no ICTA. Por ser meu melhor amigo, confidente, e porque não, bolsista, de todas as horas. Agora divido contigo essa vitória, afinal ela também é tua.

Aos meus irmãos Raquel e Fernando pela paciência e pelo estímulo sempre prestados. Por acreditarem e dividirem comigo esse sonho. Por toda a compreensão da Laurinha pelas noites não dormidas na casa da Dinda.

Aos meus amados pais... Toda minha admiração e carinho não são suficientes para agradecer tudo o que fizeram por mim. Esse é o resultado do trabalho de vocês. Agradeço a minha mãe por toda a paciência e audiência de meus pesares e reclamações, pelo apoio e incentivo, acreditando nesse trabalho, muitas vezes, mais do que eu mesma. A meu pai pelo exemplo de garra, dedicação e resignação. Muito obrigada.

RESUMO

A produção biotecnológica de xilitol e etanol mediante o cultivo de leveduras em hidrolisados hemicelulósicos obtidos a partir de resíduos agroindustriais é de grande interesse econômico. Isso porque, esse processo pode agregar valor aos resíduos lignocelulósicos, substituir o corrente e oneroso processo químico de obtenção de xilitol, além de promover um aproveitamento completo dos materiais, utilizando as frações celulósica e hemicelulósica, para a obtenção de etanol, biocombustível de grande interesse econômico e ambiental. O presente trabalho teve como objetivo ampliar os conhecimentos da produção biotecnológica de xilitol e etanol mediante o cultivo de *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075 a partir de hidrolisado de casca de soja (SHH). A melhor condição de hidrólise testada (125 °C; 1,4 % (v/v) H₂SO₄; 1 h; 1/10 relação sólido/líquido) promoveu hidrólise de 76 % da hemicelulose da casca de soja, liberando, 85 e 62 % de manose e xilose, respectivamente. Dentre os tratamentos de detoxificação testados no hidrolisado de casca de soja quatro vezes concentrado (SHH-4C), o carvão ativado (10 % (p/v)) demonstrou os melhores resultados, apresentando alto índice de remoção de contaminantes, 95 e 76 % para furfural e compostos fenólicos, respectivamente. Os parâmetros cinéticos obtidos a partir do cultivo em SHH-4C demonstraram que a pressão osmótica desse meio é maior do que a suportada por leveduras osmofílicas, revelando a característica osmotolerante da *C. guilliermondii* NRRL Y-2075. Os cultivos realizados em frascos agitados empregando SHH duas vezes concentrado (SHH-2C) resultaram na produção de etanol com altos índices de rendimento, não havendo produção de xilitol, devido, provavelmente, a uma variação na preferência do cofator da xilose redutase nesta levedura. Os cultivos de SHH-2C em batelada, avaliando-se a influência do coeficiente de transferência de oxigênio em três diferentes níveis (k_{La} de 0, 8 e 46 h⁻¹, respectivamente, anaeróbio, microaeróbio e aeróbio), comprovaram a possibilidade de produção de xilitol a partir de hidrolisado de casca de soja desde que condições limitadas de oxigênio (k_{La} de 8 h⁻¹) sejam empregadas, bem como, a boa fermentabilidade do meio dado o alto rendimento de formação de biomassa sob condições aeróbias (k_{La} de 46 h⁻¹). Os resultados obtidos no presente trabalho revelam o potencial do hidrolisado de casca de soja em aplicações biotecnológicas.

Palavras-chave: casca de soja, *Candida guilliermondii*, hidrolisado, etanol, xilitol.

ABSTRACT

The biotechnology production of xylitol and ethanol by yeasts in hemicellulosic hydrolysates from agro industrial residues has great economic interest. This process can add value to these materials; replace the expensive chemical processes currently used for xylitol production, and makes the bioconversion of lignocellulosic materials into ethanol using hemicellulose in addition to cellulose to obtain this biofuel of important economical and environmental interest. The aim of the present work was to improve the knowledge about the biotechnological production of xylitol and ethanol employing the cultivation of *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075 in soybean hull hydrolysate (SHH). The best acid hydrolysis of soybean hull (125 °C; 1.4 % (v/v) H₂SO₄; 1 h; 1/10 solid/liquid ratio) produced a hydrolysis of 76 % of hemicellulose from soybean hull, liberating approximately, 85 and 62 % of the total xylose and manose, respectively. Four-fold soybean hull hydrolysate (SHH-4C) was submitted to different detoxification treatments, of which activated charcoal 10 % (w/v) showed the best results, removing 95 and 76 % of furfural and phenol, respectively. Kinetic parameters obtained from the cultivation of *C. guilliermondii* NRRL Y-2075 on detoxified SHH-4C have shown that the osmotic pressure of this medium is higher than that supported by most osmophilic yeasts, revealing the osmotolerant characteristic of *C. guilliermondii* NRRL Y-2075. When cultivations were carried out on two times concentrated SHH (SHH-2C) in shake flasks, we obtained high yields of ethanol production. Although xylose was present in high concentrations, no xylitol was produced, probably due to some varying cofactor preference of xylose reductase in this yeast strain. Batch cultivation of SHH-2C employing as variable parameter the oxygen volumetric mass transfer coefficient (k_La), evaluating three different conditions of aeration (k_La of 0, 8 e 46 h⁻¹, respectively, anaerobic, microaerobic and aerobic) revealed that it is possible to produce xylitol from soybean hull hydrolysate if conditions of oxygen limitation are applied. Furthermore, this hydrolysate readily metabolized under aerobic conditions (k_La of 46 h⁻¹) rendering a high biomass yield. These results showed the prospect of SHH as a candidate for biotechnological process.

Keywords: soybean hull, *Candida guilliermondii*, hydrolysate, xylitol, ethanol.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	Xilitol – propriedades e aplicações	12
1.2	Produção biotecnológica de xilitol	13
1.3	Materiais lignocelulósicos e seus hidrolisados	15
1.4	Produção biotecnológica de xilitol e etanol a partir de hidrolisados hemicelulósicos	18
2	RESULTADOS	21
2.1	Resultados I – Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant <i>Candida guilliermondii</i> NRRL Y-2075	21
2.2	Resultados II – Effect of oxygen transfer rate on alcohols production from soybean hull hydrolysate	43
3	DISCUSSÃO GERAL	64
	PERSPECTIVAS	68
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
	APÊNDICE	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática das primeiras etapas da metabolização da D-xilose em leveduras	14
--	----

Resultados I

Figure 1. Cultivation of <i>C. guilliermondii</i> in synthetic medium	40
Figure 2. Cultivation of <i>C. guilliermondii</i> in synthetic medium, nondetoxified SHH-4C; detoxified SHH-4C; detoxified and supplemented with yeast extract SHH-4C; detoxified and supplemented with yeast extract and peptone SHH-4C	41
Figure 3. Cultivation of <i>C. guilliermondii</i> in (a) nondetoxified SHH-2C and (b) detoxified SHH-2C	42

Resultados II

Figure. 1. Cultivation of <i>C. guilliermondii</i> in detoxified SHH-2C under anaerobic conditions	61
Figure 2. Cultivation of <i>C. guilliermondii</i> in detoxified SHH-2C under microaerobic conditions	62
Figure 3. Cultivation of <i>C. guilliermondii</i> in detoxified SHH-2C under aerobic conditions ..	63

LISTA DE TABELAS

Resultados I

Table 1. Composition of soybean hull hydrolysates	37
Table 2. Composition of SHH, nondetoxified SHH-4C, and detoxified SHH-4C with activated charcoal 10 % (w/v).....	38
Table 3. Osmotic pressure of soybean hull hydrolysates and synthetic medium	39

Resultados II

Table 1. Composition of SHH, nondetoxified and detoxified SHH-2C with activated charcoal 10 % (w/v) and pH adjusted to 5.5.	59
Table 2. k_{La} values determined for each pair of aeration and stirring rates and the kinetic parameters for <i>Candida guilliermondii</i> tested under these oxygen conditions.	60

1 INTRODUÇÃO

Os materiais lignocelulósicos representam a maior fonte de carbono e, portanto, energia renovável da terra. Entretanto, grandes quantidades de resíduos lignocelulósicos são acumulados, anualmente, decorrentes da produção agrícola, beneficiamento de cereais, dentre inúmeras outras transformações operadas com esses recursos naturais.

O acúmulo de tais resíduos desencadeia uma sucessão de problemas. Primeiramente, encontram-se os problemas de origem ambiental, decorrentes do desequilíbrio do meio ambiente gerado pela decomposição descontrolada desse material. Entretanto, há ainda o problema de cunho econômico, dado que a degradação desses resíduos representa a perda de potenciais recursos energéticos. Deve-se ressaltar que o destino, normalmente aplicado a esses materiais, de suplementação de ração animal ou adubo ecológico, representa a subutilização de recursos passíveis de biotransformação a compostos de elevado valor agregado como combustíveis (etanol), enzimas, antibióticos, polissacarídeos, entre outros produtos de relevantes aplicações na área alimentícia e farmacêutica.

A conversão de resíduos agroindustriais mediante processos biotecnológicos permite, também, o desenvolvimento de tecnologia e ciência em países subdesenvolvidos, onde este tipo de material é mais abundante justamente pelo fato de esses países apresentarem grandes produções agrícolas, matérias-primas, e baixas produções de materiais manufaturados, cujo valor agregado é superior. Além disso, uma visão geral das publicações envolvendo tais resíduos aponta um aproveitamento regional de produtos, verificando-se produções científicas empregando subprodutos do processamento do arroz por grupos de pesquisadores da China; do milho, por grupos norte-americanos; assim como aqui no Brasil, o bagaço de cana-de-açúcar.

Nesse âmbito, vale lembrar que o Brasil é o segundo maior produtor mundial de soja, produzindo 95 milhões de toneladas do grão das 216 milhões produzidas mundialmente. O processamento de todo esse montante de soja gera, aproximadamente, 17 milhões de toneladas de casca de soja por ano, cuja subutilização como ração animal não elimina essa quantia, a qual passa a ser um problema na esfera ambiental para a indústria processadora de soja.

A utilização de resíduos lignocelulósicos em processos biotecnológicos exige, na maioria das vezes, etapas preliminares de preparação, mediante hidrólise química ou enzimática, para liberação das frações celulósica ou hemicelulósica, seja na forma de oligo ou

monossacarídeos. Raros, mas não menos importantes, são os processos que empregam diretamente esses materiais em sua forma íntegra como é caso dos cultivos em estado sólido.

A hidrólise ácida diluída consiste em uma técnica fundamentada e bastante difundida, de baixo custo, que rende a liberação das pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (manose, galactose e outros) constituintes da hemicelulose. Sendo a xilose o segundo açúcar mais abundante na biosfera, os hidrolisados obtidos por essa técnica caracterizam-se por apresentar a xilose como componente majoritário. Portanto, a utilização de hidrolisados hemicelulósicos em processos biotecnológicos torna-se ideal para a produção de diversos produtos.

Dentre tais produtos, merece atenção o xilitol, o qual tem se destacado dado suas propriedades físico-químicas, seu elevado poder adoçante e propriedades anticariogênicas e cariostáticas, sendo amplamente utilizado em alimentos e bebidas, além de formulações farmacêuticas. Além disso, a produção biotecnológica de xilitol a partir da xilose da hemicelulose de resíduos agroindustriais não representa, apenas, a agregação de valor aos resíduos, mas uma alternativa mais barata de produção de xilitol, posto que, pelo método químico utilizado correntemente, sua produção é onerada pelos processos de purificação da solução de xilose e de separação do catalisador empregado.

A produção de etanol a partir de xilose de hidrolisados hemicelulósicos tem sido tema de inúmeros trabalhos científicos. Isso porque, a utilização de hemicelulose, que atinge cerca de 50 % da composição dos materiais lignocelulósicos, juntamente com a celulose para a produção de etanol torna o processo muito mais econômico, posto que dessa forma, praticamente, todo o material é bioconvertido a esse combustível. Além disso, tecnologias alternativas para a produção de combustíveis não fósseis e, portanto, não finitos, mais baratos que o petróleo e que emitam menores quantidades de gás carbônico, de forma a desacelerar o processo do efeito estufa, têm sido intensamente investigadas.

O presente trabalho teve por objetivo ampliar os conhecimentos sobre a produção biotecnológica de xilitol e etanol mediante o cultivo de leveduras sobre o hidrolisado de casca de soja (SHH). Para tanto, em um primeiro momento, foi elaborado o hidrolisado de casca de soja utilizando-se a hidrólise ácida diluída. A fermentabilidade e possibilidade de produção de xilitol e etanol foram verificadas a partir de experimentos cultivando-se *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075 sobre SHH. Além disso, verificou-se a influência do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio na formação de xilitol, etanol e biomassa, mediante o cultivo de *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075 em SHH.

1.1 Xilitol – propriedades e aplicações

O xilitol é um poliálcool formado por cinco carbonos ($C_5H_{12}O_5$), com poder adoçante similar ao da sacarose, encontrado na natureza em frutas e vegetais (PEPPER; OLINGER, 1988). A extração de xilitol dessas fontes, entretanto, não é economicamente viável, dado que a concentração de xilitol em plantas é relativamente baixa quando comparada, por exemplo, com a concentração de sacarose na cana-de-açúcar (EMODI, 1978). Além disso, o xilitol configura-se como intermediário no metabolismo dos carboidratos dos mamíferos de tal forma que humanos adultos produzem, em média, de cinco a quinze gramas de xilitol por dia (RUSSO, 1976).

Esse poliálcool caracteriza-se por sua lenta absorção e participação das rotas metabólicas independentemente de insulina, podendo, portanto, ser utilizado como substituto de glicose para diabéticos (YLIKAHRI, 1979). Entretanto, similar a outros carboidratos completamente metabolizados, o xilitol caracteriza-se por uma fonte viável de calorias, posto que um grama desse composto confere 4,06 kcal (HYVÖNEN; KOIVISTOINEN; VOIROL, 1982). Dessa forma, o xilitol é comparável a outros carboidratos de lenta absorção, sendo 2,5 vezes mais doce que o manitol e 2,0 mais que o sorbitol, apresentando mesmo poder adoçante da sacarose em diversas condições (WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998).

A característica mais importante do xilitol reside, entretanto, no fato de esse ser um adoçante anticariogênico, posto que não é metabolizado por microrganismos específicos presentes na flora bucal, além de inibir a desmineralização dos dentes e prevenir o desenvolvimento de cáries já existentes (cariostático) (MAEKINEN, 1979).

A dissolução endotérmica, ou calor negativo de dissolução (-36,6 cal/g) do xilitol é uma importante característica de aplicação tecnológica, pois confere excelente sabor e sensação de refrescância nas cavidades bucal e nasal, similares a do mentol (EMODI, 1978). Na tecnologia de alimentos isso significa que a utilização de xilitol, em sua forma cristalina, na formulação de alimentos confere, no momento do consumo, a diminuição da temperatura da saliva e, conseqüentemente, sensação de refrescância. Tal característica é desejável em inúmeros alimentos, tais como, gomas de mascar, balas, refrigerantes, sorvetes, entre outros (NIGAM; SINGH, 1995). Gomas de mascar formuladas com xilitol são amplamente comercializadas em países como Finlândia, Alemanha e Suíça (COUNSELL; ROBERTON, 1976).

Devido a suas propriedades físico-químicas, a utilização do xilitol na indústria de alimentos tem sido ampla e crescente, principalmente, na produção de confeitos, gomas de

mascar, produtos de panificação, geléias, chocolates entre outros (PEPPER; OLINGER, 1988). Outras importantes áreas de aplicação tecnológica do xilitol são a farmacêutica e de higiene oral, dadas suas propriedades.

Dentre as diversas vantagens de aplicação do xilitol como ingrediente de formulações, destaca-se o fato de não participar de reação de Maillard responsável pelo escurecimento, bem como, a redução do valor nutricional das proteínas (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J., 1998a), podendo ser utilizado em alimentos em que o escurecimento não é desejável e que necessitam serem processados em altas temperaturas.

Quanto às aplicações tecnológicas do xilitol, deve-se ressaltar ainda que o mesmo é reconhecido como aditivo do tipo GRAS (*Generally Regarded as Safe*) pelo órgão *Food and Drug Administration* e permitido para a dieta de diabéticos, segundo o *Codex Alimentarius* (AGUIAR; OETTERES; MENEZES, 1999).

1.2 Produção biotecnológica de xilitol

Correntemente, o xilitol é produzido pela redução química (hidrogenação) da xilose pura obtida, principalmente, de hidrolisados hemicelulósicos de madeiras submetidos a sucessivas etapas de purificação tais como cromatografias de troca iônica, exclusão molecular e outras (HYVÖNEN; KOIVISTOINEN; VOIROL, 1982). Esse método, entretanto, apresenta uma série de desvantagens, tais como, o requerimento de elevadas temperaturas (80 -140 °C) e pressões (50 atm), bem como, as sucessivas etapas de purificação aplicadas ao hidrolisado hemicelulósico e à solução de xilitol, para que o mesmo seja separado do catalisador (Ni/Al₂O₃) (SAHA, 2003). Dessa forma, a produção de xilitol pelo método químico tem sido considerada muito onerosa e impactante ao meio ambiente, devido à utilização excessiva de fontes naturais de madeira, tornando a produção biotecnológica de xilitol um processo alternativo promissor (TADA et al., 2004).

A produção biotecnológica de xilitol consiste na redução da xilose a xilitol mediante a utilização de microrganismos e/ou enzimas. Embora os microrganismos assimilem e fermentem mais prontamente glicose do que xilose, existem, em menor número, bactérias, fungos filamentosos e leveduras capazes de assimilar e fermentar xilose a xilitol e outros metabólitos como etanol, dependendo, basicamente, do microrganismo e das condições de cultivo empregadas (JEFFRIES, 1983). De forma geral, entre os microrganismos, as leveduras são consideradas os melhores produtores de xilitol (WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998). Barbosa et al. (1988) avaliaram 44 leveduras para a conversão de

xilose em xilitol, concluindo que as espécies *Candida guilliermondii* e *Candida tropicalis* são as melhores produtoras de xilitol. Nas leveduras, após ser transportada para o interior da célula, por difusão facilitada ou processo ativo, a D-xilose é convertida em D-xilulose, mediante duas reações (Figura 1). A primeira consiste na redução de D-xilose a xilitol mediante xilose redutase NADPH ou NADH-dependente e a segunda é a oxidação do xilitol a D-xilulose mediante xilitol desidrogenase NAD^+ ou NADP^+ -dependente. A D-xilulose é fosforilada a D-xilulose-5-fosfato pela D-xiluloquinase antes de participar do ciclo das pentoses fosfato (GIRIO et al., 1994).

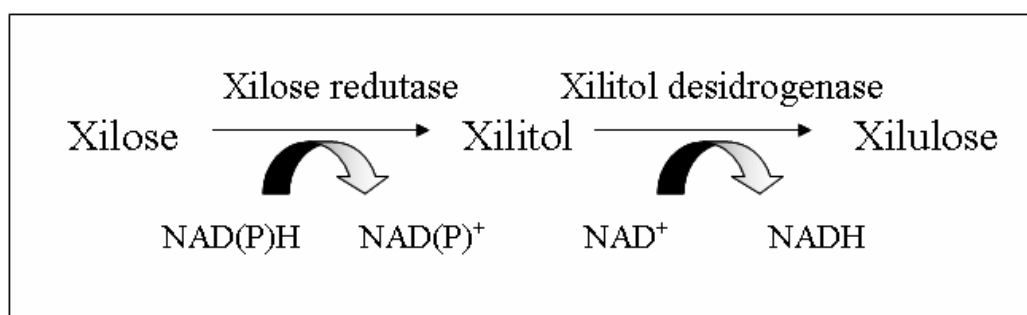


Figura 1. Representação esquemática das primeiras etapas da metabolização da D-xilose em leveduras.

Em leveduras produtoras de xilitol, a atividade da xilose redutase é, preferencialmente, NADPH-dependente e a xilitol desidrogenase, especificamente NAD^+ -dependente (YABLOCHKOVA et al., 2004). A regeneração do cofator NADPH ocorre no ciclo das pentoses fosfato enquanto a regeneração de NAD^+ , a partir de NADH, ocorre na cadeia respiratória, tendo o oxigênio como aceptor final de elétrons. Assim, sob condições limitadas de oxigênio, não há a completa re-oxidação de NADH a NAD^+ , promovendo um desequilíbrio redox. A baixa concentração de NAD^+ diminui a oxidação do xilitol a xilulose, induzindo a excreção de xilitol ao meio de cultura (DU PREEZ; VAN DRIESEL; PRIOR, 1989).

Assim, sob condições limitadas de oxigênio, a xilose não é completamente metabolizada nas leveduras, levando à produção de xilitol e/ou etanol, dependendo, basicamente, dos cofatores das enzimas envolvidas nas reações de metabolização da xilose, bem como, a regeneração de tais cofatores, de acordo com as condições de oxigênio empregadas ao longo do cultivo (BRUINENBERG et al., 1984; PANAGIOTOU et al., 2005). De acordo com Furlan, Bouilloud e Castro (1994), a partir de xilose algumas leveduras são capazes de produzir predominante etanol (*Pichia stipitis*), ou predominante xilitol (*Candida parapsilosis*), bem como, ambos os álcoois (*Pachisolen tannophilus*, *Candida shehatae*).

Segundo Yablochkova et al. (2004), as leveduras que produzem, predominantemente, xilitol apresentam 97-98 % atividade de xilose redutase para NADPH, produzindo, portanto, xilitol sob condições microaeróbias de oxigênio de modo a impedir a oxidação do xilitol formado. Já, as leveduras que produzem etanol como principal metabólito demonstram atividades de xilose redutase, principalmente, NADH-dependente. Nessas leveduras, a redução da xilose implica na obtenção de NAD^+ , recuperando, independentemente, da cadeia respiratória, o cofator da xilitol desidrogenase, permitindo assim a fermentação de xilose a etanol. As leveduras que se caracterizam por produzirem etanol e xilitol em quantidades consideráveis, apresentam atividades de xilose redutase NADPH e NADH similares, sendo a atividade NADPH-dependente favorecida sob condições limitadas de oxigênio.

A bioconversão de xilose a xilitol e/ou etanol é um processo complexo influenciado por diversos fatores, incluindo o tipo de levedura, a idade e concentração do inóculo, pH, temperatura, concentração inicial de xilose, tipo de fonte de nitrogênio, aeração e tipo de meio de cultura, segundo sua natureza como solução sintética ou hidrolisado hemicelulósico, sendo esse último afetado pela presença de outros açúcares e compostos inibidores (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J., 1998b). Dentre todos os parâmetros citados, a variável de controle mais importante nesta bioconversão é o nível de aeração, o qual afeta as rotas bioquímicas envolvidas na metabolização da xilose (ROBERTO; MANCILHA; SATO, 1999). Um parâmetro importante a ser utilizado é o coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio (k_{La}), o qual descreve muito bem a oxigenação de um sistema fermentativo. Este parâmetro está relacionado ao projeto do biorreator, suas características geométricas, e as propriedades do meio de cultura utilizado, além de proporcionar informações para processos de escalonamento (WINKELHAUSEN; AMARTEY; KUZMANOVA, 2004).

1.3 Materiais lignocelulósicos e seus hidrolisados

Os materiais lignocelulósicos são os compostos orgânicos mais abundantes na biosfera (LEE, 1997), correspondendo, aproximadamente, a 50 % da biomassa no mundo, a qual tem sido estimada em uma produção anual de 1,0 a $5,0 \times 10^{10}$ toneladas. Entretanto, são acumuladas, a cada ano, grandes quantidades de resíduos de biomassa gerados pela interferência humana na natureza através da agricultura e outras práticas. O processamento desse material cultivado gera uma quantidade descontrolada de resíduos que causam a deterioração do meio ambiente e a perda de potenciais recursos viáveis. Nesse âmbito, merecem destaque as significativas quantidades de resíduos de plantas remanescentes e

inutilizadas após as colheitas de semente de oleaginosas, dentre essas a soja (KUHAD; SINGH, 1993).

A soja consiste em uma das principais culturas do mundo, ocupando 96,2 milhões de hectares, resultando em 216,3 milhões de toneladas de grãos (USDA, 2006). O Brasil configura como o segundo maior produtor mundial de soja, destinando 40,2 milhões de hectares a essa cultura, atingindo 95 milhões de toneladas de grãos (EMBRAPA, 2006). A casca do grão de soja representa o maior subproduto das indústrias processadoras dessa semente e constitui por volta de 8 % de todo o grão (GNANASAMBANDAN; PROCTOR, 1999). De acordo com esses dados, são gerados, anualmente, em todo o mundo, aproximadamente, 17,3 milhões de toneladas de casca de soja. A fração insolúvel dos carboidratos de parede celular da casca de soja consiste em 30 % de pectina, 50 % de hemicelulose e 20 % de celulose (SNYDER; KWON, 1987).

Os materiais lignocelulósicos são matrizes complexas de lignina, celulose, hemicelulose, vários extrativos e compostos inorgânicos. A composição varia largamente dependendo da espécie da planta, idade, tempo de colheita e condição ou estágio de crescimento (JEFFRIES; JIN, 2000). A celulose é um homopolímero de unidades de β -D-glicose, enquanto a hemicelulose é um polímero heterogêneo composto principalmente de pentoses (xilose, arabinose) e hexoses (glicose, manose, galactose). Alguns tipos de hemicelulose também apresentam ácido urônico em sua composição. Os principais tipos de hemicelulose são as xilanas, arabinoxilanas, glicomanas e galacto-glicomananas (GOSH; SINGH, 1993). O grau de polimerização dos heteropolímeros de cadeia curta da hemicelulose é usualmente menor que 200. Já, a lignina é uma macromolécula tridimensional de álcoois aromáticos (SUN; CHENG, 2002). Os extrativos consistem de ceras, gorduras, resinas, taninos, óleos essenciais, compostos fenólicos, terpenos, ácidos alifáticos, álcoois e substâncias inorgânicas (KUHAD; SINGH, 1993).

A utilização de hidrolisados hemicelulósicos para a bioconversão a produtos e combustíveis de elevado valor agregado tem atraído a atenção de diversos pesquisadores, principalmente, devido às leveduras capazes de fermentar xilose, produzindo polióis e etanol, bem como a elevada concentração de xilose na fração hemicelulósica, que no caso dos produtos agrícolas atinge 80 %, em média (JEFFRIES, 1983). A xilose consiste no segundo açúcar mais abundante em plantas e, portanto, o principal obtido após os processos de hidrólise da porção hemicelulósica (JEFFRIES; JIN, 2000). Diversos resíduos agroindustriais têm sido utilizados para a obtenção de hidrolisados hemicelulósicos, mediante diferentes processos de hidrólise, entre esses destacam-se: bagaço de cana-de-açúcar (PARAJÓ;

DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J., 1998c); palha e sabugo de milho (SAHA, 2003); palha de trigo, palha de arroz, entre outros (WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998).

Os materiais lignocelulósicos devem ser tratados por processos físicos, químicos ou enzimáticos de forma a liberar os açúcares fermentescíveis ou aumentar sua susceptibilidade à hidrólise enzimática (LEE, 1997). Dentre os diversos processos de hidrólise empregados a hidrólise ácida configura como o mais antigo e mais bem estabelecido processo (TORGET et al., 1996), sendo a hidrólise ácida diluída a mais empregada para a produção de xilitol (SAHA; HAYASHI, 2004).

A hidrólise ácida diluída é um processo que emprega condições menos severas alcançando elevados rendimentos de conversão de xilana à xilose. Existem, basicamente, dois tipos de tratamento ácido diluído: elevadas temperaturas (superiores a 160 °C), processo de fluxo contínuo para baixa concentração de sólidos 5 – 10 % (peso de substrato/peso de mistura de reação) e baixa temperatura (inferior a 160 °C), processo por batelada e alta teor de sólidos (10 – 40 %). Além disso, o emprego de hidrólise ácida diluída apresenta várias vantagens quando comparada à utilização dos ácidos concentrados (SUN; CHENG, 2002). Ácidos concentrados são tóxicos, perigosos, corrosivos, requerendo reatores resistentes à corrosão. Além disso, os ácidos concentrados devem ser recuperados após a hidrólise a fim de tornar o processo economicamente viável (SIVERS; ZACCHI, 1995).

A fase líquida obtida por tal reação de hidrólise contém os açúcares constituintes da hemicelulose (xilose, arabinose e outros), bem como outros compostos considerados inibidores do processo fermentativo, ou seja, tóxicos aos microrganismos empregados (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J., 1998c). Esses compostos incluem produtos de degradação de pentoses e hexoses como furfural e hidroximetilfurfural (HMF) respectivamente; ácido fórmico oriundo da degradação do furfural e HMF; os ácidos acético, vanílico, siríngico e palmítico e compostos fenólicos decorrentes da degradação da lignina (SAHA, 2003; SAHA; HAYASHI, 2004). Assim, vários métodos de detoxificação de hidrolisados têm sido desenvolvidos, dentre eles o emprego de resinas de troca iônica, carvão ativado, enzimas lignolíticas, pré-fermentação com fungos filamentosos, tratamentos com álcalis ou sulfitos (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000a; PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000b).

1.4 Produção biotecnológica de xilitol e etanol a partir de hidrolisados hemicelulósicos

A utilização de hidrolisados hemicelulósicos como meio de cultivo para produção biotecnológica de xilitol tem se demonstrado exequível, considerando-se os rendimentos obtidos de produção de xilitol, bem como, um instrumento para aprimorar ainda mais o caráter econômico de sua produção biotecnológica, além de agregar valor aos resíduos agroindustriais. Mussatto e Roberto (2004a) obtiveram 78,5 % do rendimento teórico de conversão de xilose a xilitol (rendimento teórico consiste em 0,917 g de xilitol .g⁻¹ de xilose), empregando *C. guilliermondii* FTI 20037 e hidrolisado hemicelulósico de palha de arroz, tratado e suplementado.

Já, a produção de etanol a partir de hidrolisados hemicelulósicos configura como um processo alternativo de obtenção desse combustível para o qual todas as atenções têm se voltado dadas as suas características de combustível não fóssil, em substituição de petróleo que representa uma fonte onerosa e finita de energia, bem como, os problemas relacionados ao efeito estufa de emissão de gás carbônico (JEFFRIES, 2006). Além disso, sendo a xilose o segundo açúcar mais abundante na natureza, a conversão de biomassa à energia útil não é economicamente viável, a menos que a hemicelulose (xilose) seja convertida juntamente com a celulose (glicose).

Assim, a habilidade dos microrganismos de fermentar glicose e xilose a etanol é a chave para tornar o processo economicamente viável. Cepas selvagens de *Saccharomyces cerevisiae* não são capazes de metabolizar xilose (LYND; WYMAN; GERNGROSS, 1999). Já, leveduras tais como *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, e *Pachisolen tannophilus* são capazes de fermentar glicose e xilose a etanol. Dentre as leveduras que fermentam xilose, *P. stipitis* configura como a mais promissora para aplicação industrial, uma vez que fermenta xilose a etanol com elevado rendimento (BOTHAST; SAHA, 1997). Entretanto, sua produtividade específica de etanol é cinco vezes menor do que a obtida cultivando-se *S. cerevisiae* em glicose (CHANDAKANT; BISARIA, 1998). Diversos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de tornar cepas de *S. cerevisiae* capazes de metabolizar pentoses. Dentre esses se destaca a pesquisa realizada por Kötter et al. (1990) na qual uma cepa de *S. cerevisiae* foi construída expressando os genes codificadores da xilose redutase e xilitol desidrogenase, enzimas responsáveis pelas etapas iniciais de assimilação de xilose, derivadas de *Pichia stipitis*. Outros trabalhos também foram realizados baseados no fato de que bactérias empregam xilose isomerase para converter D-xilose em xilulose, enquanto a maioria dos fungos, leveduras, plantas e animais utilizam xilose redutase e xilitol desidrogenase

(JEFFRIES, 1983). A descoberta de que leveduras podem fermentar xilulose promoveu uma nova era no desenvolvimento de cepas de *S. cerevisiae* modificadas geneticamente pela expressão heteróloga de xilose isomerase, rendendo resultados de sucesso (JIN; LAPLAZA; JEFFRIES, 2004).

Entretanto, leveduras que fermentam xilose requerem oxigênio para seu crescimento. Um dos grandes desafios da viabilidade comercial de fermentação de xilose é o alcance de tanto crescimento celular quanto produção de etanol sob condições anaeróbias (JEFFRIES; JIN, 2000). Sob condições aeróbias, grande parte da xilose metabolizada é convertida a xilitol, o principal co-produto formado nos cultivos de xilose sob condições limitadas de oxigênio, comprometendo, assim, a produção de etanol. Inúmeras causas são atribuídas para a ineficiente incorporação das moléculas derivadas da metabolização da xilose na rota bioquímica central que culmina na formação de etanol. A causa mais importante consiste no desequilíbrio redox entre os cofatores das enzimas xilose redutase e xilitol desidrogenase, o qual ocorre sob condições limitadas de oxigênio, necessárias para que o substrato seja convertido em etanol e não biomassa. Outra causa consiste nas limitações metabólicas que ocorrem a partir da xilitol desidrogenase, incluindo a etapa de conversão de xilulose a xilulose-5-fosfato catalisada pela xiluloquinase (WALFRIDSSON et al., 1995).

Assim como a escolha ou a construção de um microrganismo geneticamente modificado são preponderantes para os bons resultados do processo biotecnológico de obtenção desses álcoois, o hidrolisado hemicelulósico deve ser adequado para servir de meio de cultivo para esse sistema (PARAJÓ; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J., 1998c). Dessa forma, de acordo com o exposto anteriormente, os materiais lignocelulósicos, após serem submetidos ao processo de hidrólise, liberando açúcares, principalmente xilose e manose, bem como, os compostos tóxicos, devem ser submetidos a tratamentos de detoxificação a fim de que tais inibidores sejam removidos. Quando comparados com a fermentação de meios sintéticos ou hidrolisados detoxificados, a fermentação de hidrolisados não-detoxificados caracteriza-se por cinéticas lentas, com rendimentos e produtividades limitados, devido à presença de compostos que atuam como inibidores do metabolismo microbiano (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000a).

Além dos tratamentos de detoxificação convencionais, diversas operações realizadas ao longo do processo de obtenção do hidrolisado configuram como métodos físicos ou químicos de tratamento. A concentração por evaporação a vácuo, usada com o objetivo de aumentar a concentração dos açúcares, por exemplo, também é considerado um método físico de detoxificação, pois, dependendo das condições aplicadas (temperatura e pressão) ocorre a

redução de compostos voláteis, tais como, ácido acético e furfural (MUSSATTO; ROBERTO, 2004b). A precipitação de compostos tóxicos mediante ajuste de pH para os valores ideais de cultivo consiste em método químico de detoxificação (MARTINEZ et al., 2001).

Segundo Mussatto e Roberto (2004b), o carvão ativado tem sido amplamente utilizado para remover compostos tóxicos de hidrolisados por adsorção, dado seu baixo custo e facilidade de execução. Entretanto, a eficiência do tratamento de carvão ativado depende das variáveis empregadas no processo de adsorção: pH, temperatura, tempo de contato e concentração do carvão ativado utilizada. Deve-se ressaltar que a eficiência do método deve ser avaliada não apenas baseando-se no grau de remoção dos compostos inibidores, mas também, no tocante à perda de açúcar, sendo esses resultados específicos para cada hidrolisado (PALMIQVIST, HAHN-HÄGERDAL, 2000a).

De acordo com a literatura, concentrações de furfural inferiores a 1 g.L^{-1} têm sido descritas como, praticamente, inofensivas aos microrganismos nos processos fermentativos. Já, o ácido acético configura como tóxico ao microrganismo em concentrações superiores a 3 g.L^{-1} , enquanto os produtos de degradação da lignina (compostos fenólicos) são tóxicos aos microrganismos mesmo quando suas concentrações são baixas (FELIPE et al., 1995; PARAJÓ; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J., 1998b; ROBERTO et al., 1991). Caso o hidrolisado não-detoxificado apresente concentrações de inibidores inferiores às apresentadas, mesmo nessa condição o tratamento de detoxificação é recomendado. Isso porque, devido a efeitos sinérgicos, tais compostos podem inibir a fermentação mesmo quando seus níveis individuais estejam abaixo do crítico (PREZIOSI-BELLOY; NOLLEAU; NAVARRO, 1997).

2 RESULTADOS

Os resultados deste trabalho estão apresentados na forma de artigos científicos. Os artigos constituintes desse capítulo estão apresentados nos itens Resultados I e II, respectivamente, de acordo com as normas exigidas pelos periódicos aos quais serão submetidos.

2.1 Resultados I – Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075

O primeiro artigo intitulado “Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075” consiste na elaboração do hidrolisado de casca de soja, bem como, seu tratamento de detoxificação, empregando apenas hidróxido de sódio e carvão ativado. Este artigo contemplou, também, a avaliação da capacidade de fermentação da levedura *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075 em hidrolisado de casca de soja duas e quatro vezes concentrado, detoxificado ou não, em termos de consumo de substrato, produção de biomassa e formação de produtos. Este artigo será submetido ao periódico Bioresource Technology. Os resultados não apresentados neste artigo encontram-se no Apêndice A.

Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075

**Ângela Cristina Schirmer-Michel, Simone Hickmann Flôres, Plinho Francisco Hertz,
Gilvane Souza Matos, Marco Antonio Záchia Ayub***

**Food Science & Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul State,
Av. Bento Goncalves, 9500, PO Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.**

Abstract

In this research, we studied the use of soybean hull hydrolysate (SHH) as substrate for ethanol and xylitol production using an osmotolerant strain of *Candida guilliermondii*. The best acid hydrolysis of soybean hull achieved a recovery of 85 and 62 % of xylose and manose, respectively. Among detoxification treatments, activated charcoal 10 % (w/v) showed the best results. Kinetic parameters obtained from the cultivation on four-fold concentrated SHH have shown that the osmotic pressure of this medium is higher than that supported by most osmophilic yeasts, revealing the osmotolerant characteristic of *C. guilliermondii* NRRL Y-2075. When cultivations were carried out on two times concentrated SHH, we obtained high yields of ethanol production, showing the prospect of SHH as a candidate for this biofuel production. Although xylose was present in high concentrations, no xylitol was produced, probably due to some varying cofactor preference of xylose reductase in this yeast strain.

Keywords: *Candida guilliermondii*, soybean hull, hydrolysate, ethanol production, xylitol, osmotic pressure.

* Corresponding author. Phone: +55 51 3316 6685; Fax +55 51 33167048;
e-mail mazayub@ufrgs.br

1. Introduction

Lignocellulosic biomass is the most abundant and renewable organic compound in the biosphere; it comprises three major groups of polymers: cellulose, hemicellulose, and lignin (Lee, 1997). Biomass in the form of agro-industrial wastes is produced in large quantities generating environmental problems and loss of potentially valuable resources (Kuhad and Singh, 1993).

Soybean (*Glycine max*) is the most cultivated plant worldwide, with its production reaching 96.2 millions of hectares, resulting in 216.3 millions tons of grains per year (USDA, 2006). Soy hulls represent the major by-product of soybean processing industry and constitute about 8 % of the whole seed (Gnanasambandan and Proctor, 1999). According to this data, approximately 17.30 millions tons of soybean hull are produced every year. The insoluble carbohydrate fraction of soy hull cell walls consists of 30 % pectin, 50 % hemicellulose and 20 % cellulose (Snyder and Kwon, 1987).

Hemicellulose is the second most common polysaccharide in nature (Saha, 2003). Hemicelluloses are heterogeneous polymers composed of hexoses (glucose, manose, and galactose), pentoses (xylose and arabinose) and uronic acid (Jeffries and Jin, 2000; Kuhad and Singh, 1993). The utilization of hemicellulose for bioconversion to value-added fuels and chemicals has attracted much attention, specially, due to xylose-fermenting yeasts ability to produce polyols and ethanol from xylose (Jeffries, 2006). However, in order to use these materials in bioprocesses, either chemical or enzymatic hydrolysis of them must be performed, in order to render the sugars soluble and available to microorganisms. Diluted sulphuric acid has been the most used so far for converting hemicellulose into fermentable sugars with high reaction rates, especially because it is a low cost technology (Jeffries and Jin, 2000). The liquid phase from the hydrolysis reaction, containing xylose and other

hemicelulosic monosaccharides, besides other compounds derived from lignin, can then be utilized for bioconversion.

Xylitol is a five carbon sugar alcohol, which has attracted much attention due to its high sweetening power, anticariogenic properties, and possible uses in diabetics diets and products. These properties, together with its high negative heat of solution, make xylitol an attractive sucrose substitute in the food industry (Emodi, 1978; Pepper and Olinger, 1988). The chemical production of xylitol needs expensive refining treatments, granting, therefore, biotechnological research for its production, being yeasts the most studied producers of this polyol (Nigam and Singh, 1995).

Ethanol is a renewable energy source produced by cultivation of sugars and it is an attractive alternative for the partial replacement of fossil fuel (Jeffries, 2006; Sun and Cheng, 2002). Traditionally, fermented sucrose from sugarcane has been the major source of ethanol. However, the use of agro-industrial by-products, such as soybean hull, for the commercial production of ethanol is a promising technology, which depends upon a list of factors, among them the use of xylose-assimilating yeast strains; hydrolysate composition (monosaccharides and inhibitors); and the control of oxygen supply during cultivation (Kuhad and Singh, 1993; Sun and Cheng, 2002).

The aims of our work were to develop an acid hydrolysate of soybean hull to a maximum yield of xylose and minimum formation of inhibitory compounds and to treat this hydrolysate in order to reduce such inhibitory compounds with sodium hydroxide and activate charcoal. We also studied the cultivation capabilities of *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075 in two and four fold concentrated SHH, detoxified or non-detoxified, in terms of substrate consumption, biomass and alcohols production.

2. Materials and methods

2.1. *Microorganism, maintenance and inoculum*

Candida guilliermondii NRRL Y-2075 used in this study was maintained on YM agar slants containing (g.L⁻¹): yeast extract, 3; malt extract, 3; peptone, 5; glucose, 10; agar, 20. The medium used for inoculum of synthetic media contained (g.L⁻¹): yeast extract, 3; malt extract, 3; peptone, 5; xylose, 30; glucose, 10; whereas the medium used for inoculum of SHH contained (g.L⁻¹): yeast extract, 3; malt extract, 3; peptone, 5; glucose, 30. Xylose and glucose were autoclaved separately at 120 °C, 15 min. Inocula were prepared by cultivation of the yeast in 1000 mL Erlenmeyer flasks containing 200 mL of the medium. Cells were cultivated at 140 rpm, 30 °C for 24 h and were subsequently recovered by centrifugation (1000 g, 10 min). The cell pellet was washed and suspended directly into the cultivation broth.

2.2. *Soybean hull hydrolysate preparation*

Soybean hulls were supplied by The Solae Company (Esteio, Brazil). The hulls were milled to a particle size less than 1 mm in diameter. The tested conditions for the hydrolysis were temperature (100, 120, 125 °C) and sulphuric acid solutions (0.2; 0.8; 1.4 % (v/v)). The solid/liquid ratio was kept at 1/10 and the reaction time was 1 h. After the hydrolysis, the remaining solid material was separated by filtration and the filtrate was stored at 4 °C. The optimal hydrolysis condition, which was defined as yields of liberated xylose, was used for cultivation experiments. The liquid phase from the optimal hydrolysis was concentrated two (SHH-2C) and four-folds (SHH-4C) under vacuum in an evaporator at 70 °C.

2.3. *Detoxification of soybean hull hydrolysate*

Detoxification assays were carried out over the SHH-4C to evaluate the effects of activated charcoal that minimizes the concentration of the main cultivation inhibitors.

Charcoal was mixed with SHH-4C, previously adjusted to pH 2.5, in different concentrations (1; 2; 5; and 10 % (w/v)) and was stirred in an orbital shaker at 140 rpm, 30 °C, for 1 h. The pH of treated SHH-4C was then corrected to 5.5 with NaOH pellets.

2.4. Media and cultivation conditions

Experiments in synthetic medium were used to compare the cultivation kinetics with those over hydrolysates. The synthetic medium consisted of (g.L⁻¹): yeast extract, 3; malt extract, 3; peptone, 5; xylose, 30. The pH of nondetoxified hydrolysates was corrected to 5.5 with NaOH pellets. No supplementation was added to the hydrolysates media SHH-2C, whereas for some experiments with SHH-4C we supplemented this medium with yeast extract (3 g.L⁻¹) or yeast extract (3 g.L⁻¹) plus peptone (5 g.L⁻¹). The cultures were inoculated at an initial cell concentration of 1-1.5 g.L⁻¹. Cultivations were carried out in 125 mL Erlenmeyer flasks with a total medium volume of 50 mL in an orbital shaker at 120 rpm, 30 °C, for 168 h for synthetic media and 120 h for hydrolysates media. Samples were taken at 24 h time intervals to determine the concentrations of cell mass, residual sugars, xylitol and ethanol in the broth. All experiments were carried out in duplicates. The oxygen volumetric transfer rate (k_{La}), for both synthetic and SHH media, were measured in 2 L bioreactor (BBraun, Germany) fitted with a polarographic oxygen probe, using the dynamic gassing-out method.

2.5. Analytical methods

Monosaccharides (glucose, manose, xylose, and arabinose), xylitol and glycerol concentrations were determined by HPLC (Perkin Elmer Series 200, USA) with a refractive index (RI) detector and a Phenomenex RHM-monosaccharide column (300 mm x 7.8 mm), at 70 °C, using ultra pure water as eluent, flow of 0.6 mL.min⁻¹ and sample volume of 20 µL. Acetic acid and furfural content were measured using a gas chromatograph (CG-14B,

Shimadzu, Japan) with a flame ionization detector (FID) and Carbowax column (60 m x 0.25 mm). Measures were carried out using nitrogen as gas carrier and n-propanol as the internal standard, the temperature of the detector and injection was 250 °C, according to William and Onwudili (2005). Ethanol concentration was determined by using a gas chromatograph with a flame ionization detector (FID) and DB-1 column (30 m x 0.25 mm), n-propanol as internal standard. Phenolic compounds were measured spectrophotometrically using the Folin-Ciocalteu method according to Coseteng and Lee (1987). The osmotic pressure of hydrolysates was determined using Vapor Pressure Osmometer (Vapro 5520, USA). Biomass was quantified gravimetrically as dry weight of cells. Samples were centrifuged, washed twice with cold distilled water, and dried in pre-weighed plastic tubes at 80 °C to a constant weight in vacuum-oven. Determination of moisture, ash, crude protein, lipids and total fibre content of soybean hull was done according to standard methods (AOAC, 1995).

3. Results and discussion

3.1. Composition of soybean hull and its acid hydrolysate

The main composition of soybean hull, determined on dry basis, was: proteins, 14.38 %; ashes, 4.94 %; lipids 3.97 %; and carbohydrates, 76.71 %. Carbohydrates content of soybean hull represents 6.14 % of whole seed dry matter and was in agreement with those reported by Stombaugh et al. (2000) who analysed the seed coat of five different soybean genotypes.

The cell wall polysaccharides (CWP) of soy hull consist of 30 % pectin, which presents in its composition arabinose (side chain), galactose, rhamnose, fucose and uronic acids; 50 % hemicellulose, composed mainly of manose and xylose; and 20 % cellulose, mainly glucose (Huisman et al., 1998; Stombaugh et al., 2000; Snyder and Kwon, 1987).

Table 1 shows the results obtained from the acid hydrolysis applying different conditions, showing the direct association between recoverable monosaccharides concentration and the temperature and acidity conditions employed. Similar results were observed by Grohmann and Bothast (1997) for the hydrolysis of corn fibre. Arabinose was released first from the lignocellulosic structure, probably due to the high susceptibility of the arabinosyl linkages to hydrolysis with hot dilute acids (BeMiller, 1967). According to Aspinall et al. (1966), the non-cellulosic polysaccharides from soybean hull hydrolyzes mainly to manose and xylose. In this research, the pentoses xylose and arabinose, and the hexose manose, were the main compounds formed, indicating that the hemicellulose and also pectin were hydrolyzed. In our work, the hydrolysis under 125 °C and 1.4 % (v/v) sulphuric acid recovered, in the form of monosaccharides, 7.8 g.L⁻¹ xylose and 3.9 g.L⁻¹ manose. According to Stombaugh et al. (2000), these values represent that about 76 % of hemicellulose from soybean hull have been hydrolyzed, liberating approximately, 85 and 62 % of the total xylose and manose, respectively. Glucose concentration was very low, showing that cellulose was practically not hydrolysed. However, the hydrolysis produced toxic compounds identified as acetic acid, furfural, hydroxymethylfurfural (HMF), and soluble lignin derivatives. As reported by Felipe et al. (1995), acetic acid at concentrations higher than 3 g.L⁻¹ are toxic for *C. guilliermondii*, so the acetic acid concentration of 1.04 g.L⁻¹ should not affect the microorganism metabolism during cultivations. Therefore, the conditions of hydrolysis did not promote the degradation of pentose sugars, since furfural concentration was very low, whereas xylose and arabinose were almost completely recovered, rendering this procedure as suitable for the hydrolysis of soybean hull to be used as cultivation medium for *C. guilliermondii*.

3.2. Detoxification of soybean hull hemicellulose hydrolysate

In order to increase the concentration of carbon sources, which is a critical factor affecting the fermentative process to produce either xylitol or ethanol, the hydrolysates were concentrated four-fold (SHH-4C) for making cultivation media with approximately 30 g.L⁻¹ of xylose. In this process, inhibitory products are also concentrated and it is, therefore, necessary to run a detoxification procedure before media can be suited for cultivation. Table 2 shows the composition of SHH and SHH-4C before and after detoxification. The concentration by vacuum evaporation produced a small increase in the concentration of acetic acid, whereas furfural and phenolic compounds were four-fold concentrated. Sugars degradation was not significant in the concentration process. The adjustment of pH to 5.5 (result not shown) promoted a reduction of 89.28 and 28.85 % in the concentrations of furfural and phenol, respectively, leading to the precipitation of toxic compounds. Martínez et al. (2001), by adjusting the pH of sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate to 9.0, at 60 °C, removed about of 51 % of total furans and 41 % of phenolic compounds.

The results of detoxification with activated charcoal at 10 % (w/v) concentration (Table 2) were the best of all the treatments tested and promoted a reduction of 94.64 % in the furfural content, 75.74 % in phenolic compounds, and 36.78 % in acetic acid, producing a hydrolysate in which inhibitory compounds concentration were lower than that causing negative effects on microorganisms cultivation (Felipe et al., 1995; Mussatto and Roberto, 2004).

3.3. Cultivation of *C. guilliermondii* on synthetic media and soybean hull hydrolysate

Figure 1 shows the xylose consumption, cell growth, and xylitol and glycerol formation in synthetic medium, which we used as comparison with cultivations on SHH. *C. guilliermondii* NRRL Y-2075 utilized the xylitol and glycerol formed when the xylose

concentration reached approximately 13 g.L^{-1} and xylitol 0.38 g.L^{-1} , respectively. Consequently, cell growth and xylitol yields and productivities were determined at the maximum xylitol concentration (48 h of cultivation) and not at the end of run. The maximum xylitol production was 5.09 g.L^{-1} , corresponding an yield ($Y_{p/s}$) of 0.34 g.g^{-1} and a volumetric productivity (Q_p) of $0.11 \text{ g.(L.h)}^{-1}$. Our results are in agreement with those for *C. guilliermondii* strain (17-07), but somewhat lower when compared with *C. guilliermondii* strain FTI 20037 that presented $Y_{p/s} 0.53 \text{ g.g}^{-1}$, both cultivated in synthetic media containing 30 g.L^{-1} xylose (Barbosa et al., 1988). The initial glycerol production coincided with the maximum xylitol production (48 h). According to Yablochkova et al. (2004), who studied the interactions of culture volume and agitation speed in shaker flasks and measured the oxygen transfer rates in these systems, the conditions used in our experiments could be classified as microaerobic (125 mL Erlenmeyer flasks containing 50 mL of medium, under agitation of 120 rpm), i.e, there were oxygen limitations during the cultivations, resulting in NADH accumulation, liberating glycerol as a redox sink for excess NADH (Granström et al., 2001). The xylose and xylitol were completely exhausted in 144 h cultivation. At the end of run, glycerol was also totally exhausted. Cell mass yield on xylose ($Y_{x/s}$), measured at 48 h of cultivation, was 0.39 g.g^{-1} , corresponding a concentration of $6.87 \text{ g cells.L}^{-1}$. The biomass concentration at the end of the run was $13.68 \text{ g cells.L}^{-1}$, with total $Y_{x/s}$ of $0.30 \text{ g cells.g}^{-1}$ substrate.

Figure 2 shows the cell growth kinetics of four types of SHH-4C tested (detoxified; nondetoxified; detoxified supplemented with yeast extract; and detoxified supplemented with yeast extract and peptone) comparing to the synthetic media. Results show that, independent of the treatment, cell growth was the same for all hydrolysates and inferior compared to the synthetic medium. No xylose was metabolized in these experiments. Since inhibitory compounds concentrations were low, these results could only be explained by the osmotic

pressure of the medium. Results on table 3 show that SHH-4C presented an osmotic pressure 11 times higher ($2948 \text{ mOsm.kg}^{-1}$) than that of the synthetic media. According to Liu et al (2006), an osmotic pressure of $2108 \text{ mOsm.kg}^{-1}$ was enough to stop the cell growth of yeasts, even for osmophilic strains such as *C. krusei*. The fact that *C. guilliermondii* NRRL Y-2075 was able to grow a little and showed high viability ($> 95 \%$; results not shown) in SHH-4C, suggests that this strain is osmotolerant yeast. Some other few strains of the genus *Candida*, such as *C. guilliermondii* BR182, were also characterized as an osmotolerant yeasts since they are capable of high trehalose cell accumulation (Ribeiro et al., 1999).

In order to reduce the osmotic pressure, two-fold concentrated soybean hull hydrolysate (SHH-2C) were used for cultivations. Figure 3 shows glucose, manose, xylose, and arabinose consumption, cell growth and ethanol formation for cultivations employing nondetoxified and detoxified SHH-2C. The cell growth was lower in the nondetoxified SHH-2C, $6.39 \text{ g cells.L}^{-1}$, with $Y_{x/s}$ of 0.17 g.g^{-1} , compared with $9.30 \text{ g cells.L}^{-1}$ ($Y_{x/s} = 0.29 \text{ g.g}^{-1}$) for detoxified hydrolysate. Although these differences, the volumetric total sugar consumption (Q_s) for nondetoxified and detoxified hydrolysates were very close: 0.24 and $0.22 \text{ g.(L.h)}^{-1}$ respectively.

For nondetoxified SHH-2C, ethanol accumulated to a final volumetric concentration of 5.66 g.L^{-1} and a product yield ($Y_{p/s}$) of $0.46 \text{ g ethanol.g}^{-1}$ of sugar in 48 h. For detoxified hydrolysate, the maximum ethanol concentration was 5.78 g.L^{-1} with $Y_{p/s} = 0.53 \text{ g ethanol.g}^{-1}$ of sugar after 24 h of cultivation. Results show that in the first 24 h cultivation, the hexoses (glucose and manose) were completely depleted. After that, the xylose started to be consumed, followed by arabinose. This preferential order for monosaccharides consumption has been showed by Parajó et al. (1998). The cultivations showed diauxic kinetics, with ethanol and xylose consumption in the second phase. This phenomenon was observed by Guo et al. (2006) employing a wild type *C. maltosa* Xu316 cultured in a YSC-xylose (50 g.L^{-1})

medium and by Toivari et al. (2001) using a genetically modified *S. cerevisiae* strain presenting genes coding for xylose reductase and xylitol dehydrogenase in a synthetic complete media (YSC). According to these authors, xylose conversion to ethanol continues until the residual xylose concentration is around 10 g.L^{-1} , when cells began consuming the ethanol formed in the first phase. The inability of the yeast to convert xylose to ethanol at residual xylose levels ($10 \text{ g.L}^{-1} = 65 \text{ mM}$) is likely to be due to a limitation in xylose transport (Toivari et al, 2001).

The ability of the strain used in this work in producing xylitol was verified in the synthetic medium but not on SHH. Although the same cultivation conditions, such as flask volume, medium volume, agitation speed, temperature and pH, were employed for the experiments utilizing both synthetic medium and SHH-2C, the physic-chemical properties of the liquid (viscosity, and density) were altered due to the high medium concentration of sugars and salts, which, in turn, altered the medium osmotic pressure. Indeed, the dissolved oxygen concentration in SHH medium was much lower than that measured in the synthetic medium: the volumetric oxygen transfer rate, k_{la} , measured for these media were, respectively, 27 h^{-1} and 61 h^{-1} . This means that the SHH cultivations were carried out under oxygen limitations more strictly than the microaerobic condition in the synthetic medium cultivations. The production of ethanol but not xylitol in the present work could be explained by the fact that, according to Granström et al. (2001), under very limited oxygen conditions, it is possible that increased NADH accumulation may act as an inhibitor for NADPH-dependent xylose reductase, decreasing its activity, therefore affecting the cofactor preference of xylose reductase from NADPH to NADH. The change in the cofactor preference from NADPH to NADH for the xylose reductase implies that NAD^+ is obtained with xylose reduction, recovering the xylitol dehydrogenase cofactor and promoting the ethanol fermentation of xylose (Yablochkova et al., 2004) and no xylitol accumulation.

4. Conclusion

The present study demonstrates that *C. guilliermondii* NRRL Y-2075 is able to grow in concentrated soybean hull hydrolysate, which presented a very high osmotic pressure, higher than that supported by other osmophilic yeasts. Under the conditions used in our work, ethanol was produced with very high yields by *C. guilliermondii* NRRL Y-2075 from non-supplemented and concentrated soybean hull hydrolysate, employing xylose as one of its substrates. These results show the prospect for the use of soybean hull, an important agro-industrial waste, as a potential substrate to generate acid hydrolysates for biofuel production. Further studies are granted for scaling-up the process of ethanol production on SHH and to determine whether other conditions of oxygen supply could render this medium as suitable for xylitol production.

Acknowledgments

The authors wish to thank CAPES for scholarships and CNPq for the financial support of this work.

References

- Aspinall, G.O., Hunt, K., Morrison, I.M., 1966. Polysaccharides of soybeans: II. Fractionation of hull cell-wall polysaccharides and the structure of a xylan. *J. Chem. Soc.* 21, 1945-1949.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1995. Methods of analysis of the association of official analytical chemists. Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC.
- Barbosa, F.S., Medeiros, M.B., Mancilha, I.M., Schneider, H., Lee, H., 1988. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. *J. Ind. Microbiol.* 3, 241-251.
- BeMiller, J.N., 1967. Acid-catalysed hydrolysis of glycosides. *Adv. Carbohydr. Chem.* 22, 25-107.
- Coseteng, M.Y., Lee, C. 1987. Changes in apple polyphenoloxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning. *J. Food Sci.* 52 (4), 985-989.
- Emodi, A., 1978. Xylitol, its properties and food applications. *Food Technol.* 32, 20-32.
- Felipe, M.G.A, Vieira, D.C., Vitolo, M., Silva, S.S., Roberto, I.C., Mancilha, I.M., 1995. Effect of acetic acid on xylose cultivation by *Candida guilliermondii*. *J. Basic Microbiol.* 35 (3), 171-177.
- Gnanasambandan, R., Proctor, A., 1999. Preparation of soy hull pectin. *Food Chem.* 65, 461-467.
- Granström, T., Ojamo, H., Leisola, M., 2001. Chemostat study of xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 36-42.
- Grohmann, K., Bothast, R., 1997. Saccharification of corn fibre by combined treatment with dilute sulphuric acid and enzymes. *Process Biochem.* 32 (5), 405-415.

- Guo, C., He, P., Lu, D., Shen, A., Jiang, N., 2006. Cloning and molecular characterization of a gene coding D-xylulokinase (*CmXYL3*) from *Candida maltosa*. J. Appl. Microbiol. 101, 139-150.
- Huisman, M.M.H., Schols, H.A., Voragen, A.G.J., 1998. Cell wall polysaccharides from soybean (*Glycine max.*) meal. Isolation and characterization. Carbohydr. Polym. 37, 87-95.
- Jeffries, T.W., 2006. Engineering yeasts for xylose metabolism. Curr. Opin. Biotechnol. 17, 320-326.
- Jeffries, T.W., Jin, Y., 2000. Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts. Adv. Appl. Microbiol. 47, 221-268.
- Kuhad, R.C., Singh, A., 1993. Lignocellulose biotechnology: current and future prospects. Crit. Rev. Biotechnol. 13 (2), 151-172.
- Lee, J., 1997. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. J. Biotechnol. 56, 1-24.
- Liu, H.J., Liu, D.H., Zhong, J.J., 2006. Quantitative response of trehalose and glycerol syntheses by *Candida krusei* to osmotic stress of the medium. Process Biochem. 41, 473-476.
- Martínez, A., Rodríguez, M.E., Wells, M.L., Cork, S.W., Preston, J.F., Ingram, L.O., 2001. Detoxification of dilute acid hydrolysates of lignocellulose with lime. Biotechnol. Progr. 17, 287, 293.
- Mussatto, S.I., Roberto, I.C., 2004. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolysates for use in fermentative processes: a review. Bioresour. Technol. 93, 1-10.
- Nigam, P., Singh, D., 1995. Processes for fermentative production of xylitol – a sugar substitute. Process Biochem. 30 (2), 117-124.

- Parajó, J.C., Domínguez, H., Dominguez, J.M., 1998. Biotechnological production of xylitol. Part 2: Operation in culture media made with commercial sugars. *Bioresour. Technol.* 65, 203-212.
- Pepper, T., Olinger, M., 1988. Xylitol in sugar-free confections. *Food Technol.* 10, 98-106.
- Ribeiro, M.J.S., Leão, L.S.C., Maorais, P.B., Rosa, C.A., Panek, A.D., 1999. Trehalose accumulation by tropical yeast strains submitted to stress conditions. *Antonie van Leeuwenhoek.* 75, 245-251.
- Saha, B.C., 2003. Hemicellulose bioconversion. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30, 279-291.
- Snyder, H.E., Kwon, T.W., 1987. Soybean utilization. Van Nostrand Reinhold, New York, p.60.
- Stombaugh, S.K., Jung, H.G., Orf, J.H., Somers, D.A., 2000. Genotypic and environmental variation in soybean seed cell wall polysaccharides. *Crop Physiol. Metabolism.* 40, 408-412.
- Sun, Y., Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour. Technol.* 83, 1-11.
- Toivari, M.H., Aristidou, A., Ruohonen, L., Penttillä, M., 2001. Conversion of xylose to ethanol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*: Importance of xylulokinase (*XKS1*) and oxygen viability. *Metabolic Engineering.* 3, 236-249.
- United States Department of Agriculture (USDA). September, 2006. Economic Research Service - Soybeans and Oil Crops: Market Outlook. Retrieved from: <http://www.ers.usda.gov/briefing/SoybeansOilcrops/marketoutlook.htm>
- William, P.T., Onwudili, J., 2005. Composition of products from the supercritical water gasification of glucose: a model biomass compound. *Ind. Eng. Chem. Res.* 44, 8739-3749.
- Yablochkova, E.N., Bolotnikova, O.I., Mikhailova, N.P., Nemova, N.N., Ginak, A.I., 2004. The activity of key enzymes in xylose-assimilating yeasts at different rates of oxygen transfer to the cultivation medium. *Microbiol.* 73 (2), 129-133.

Table 1. Composition of soybean hull hydrolysates

Condition*	Compound (g.L ⁻¹)					
	Xylose	Arabinose	Manose	Glucose	Furfural	Acetic acid
100; 0.2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04	0.29
100; 0.8	0.99	5.32	0.00	0.00	0.04	0.78
100; 1.4	2.17	5.41	0.83	0.10	0.07	1.10
120; 0.2	0.19	0.86	0.00	0.00	0.02	0.38
120; 0.8	5.06	6.64	2.97	0.24	0.04	0.96
120; 1.4	6.61	5.81	3.48	0.32	0.19	1.05
125; 0.2	1.15	2.72	0.00	0.00	0.02	0.37
125; 0.8	5.15	6.14	2.91	0.25	0.19	0.88
125; 1.4	7.78	6.46	3.88	0.38	0.28	1.04

* Condition expressed as temperature (°C); H₂SO₄ (% (v/v)), solid/liquid rate and residence reaction time were kept constant, 1/10 and 1 h, respectively.

Table 2. Composition of SHH, nondetoxified SHH-4C, and detoxified SHH-4C with activated charcoal 10 % (w/v)

Compound (g.L ⁻¹)	SHH	Nondetoxified SHH-4C	Detoxified SHH-4C
Xylose	7.78	30.93	28.57
Arabinose	6.46	29.98	27.30
Manose	3.88	17.89	16.47
Glucose	0.38	1.65	1.52
Furfural	0.28	1.12	0.06
Acetic acid	1.04	1.74	1.10
Phenol compounds	0.75	3.05	0.74

Table 3. Osmotic pressure of soybean hull hydrolysates and synthetic medium

Media	Osmotic Pressure (mOsm.kg ⁻¹)
SHH-4C; nondetoxified	2948
SHH-4C; detoxified	2911
SHH-2C; nondetoxified	1584
SHH-2C; detoxified	1413
Synthetic medium	263

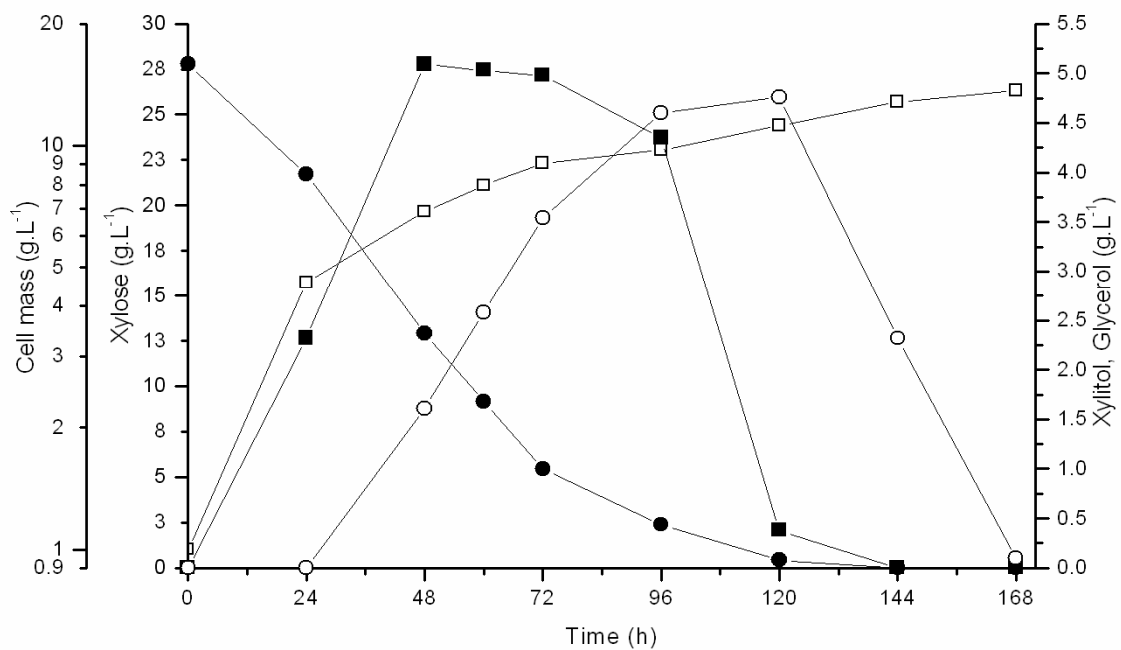


Fig. 1. Cultivation of *C. guilliermondii* in synthetic medium: cell mass (\square); xylose (\bullet); xylitol (\blacksquare); glycerol (\circ). Results are the mean of two experiments.

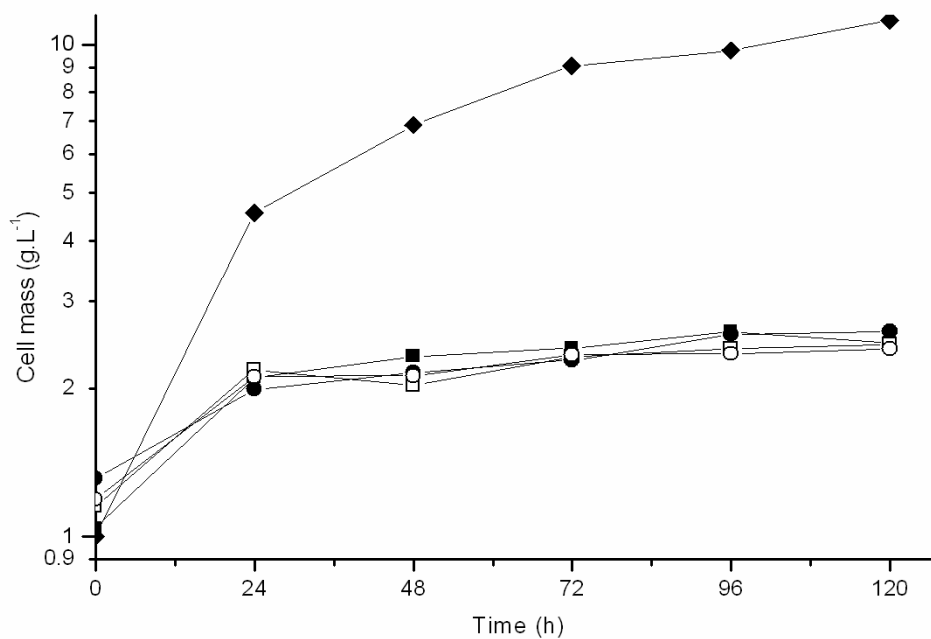


Fig. 2. Cultivation of *C. guilliermondii* in synthetic medium (◆); nondetoxified SHH-4C (■); detoxified SHH-4C (□); detoxified and supplemented with yeast extract SHH-4C (●); detoxified and supplemented with yeast extract and peptone SHH-4C (○). Results are the mean of two experiments.

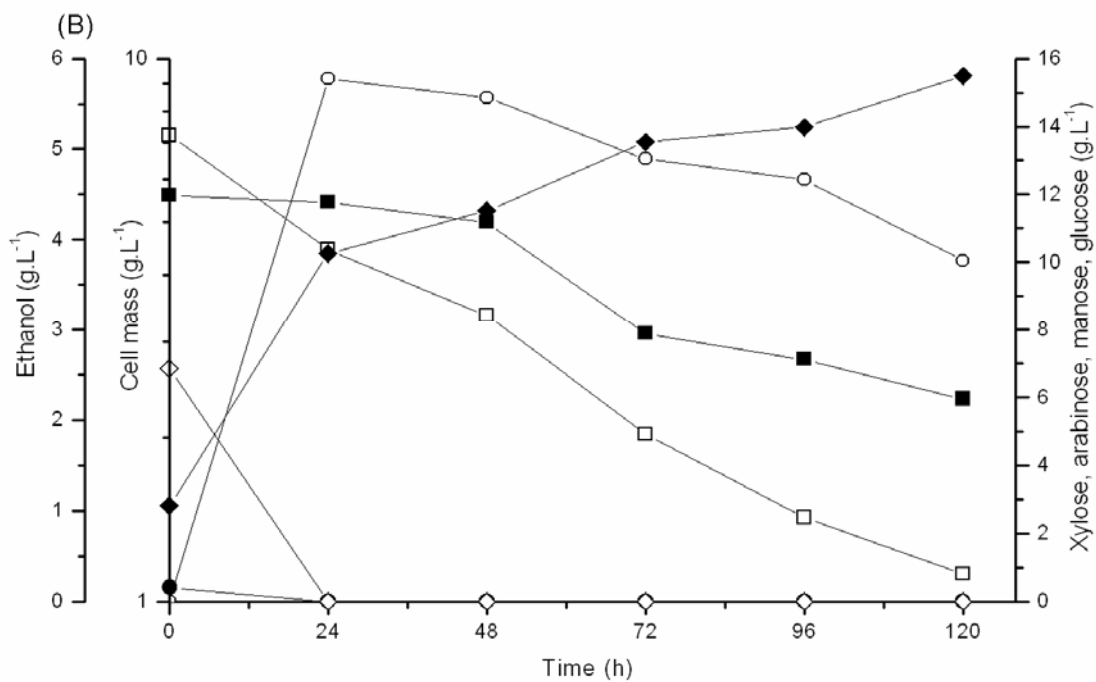
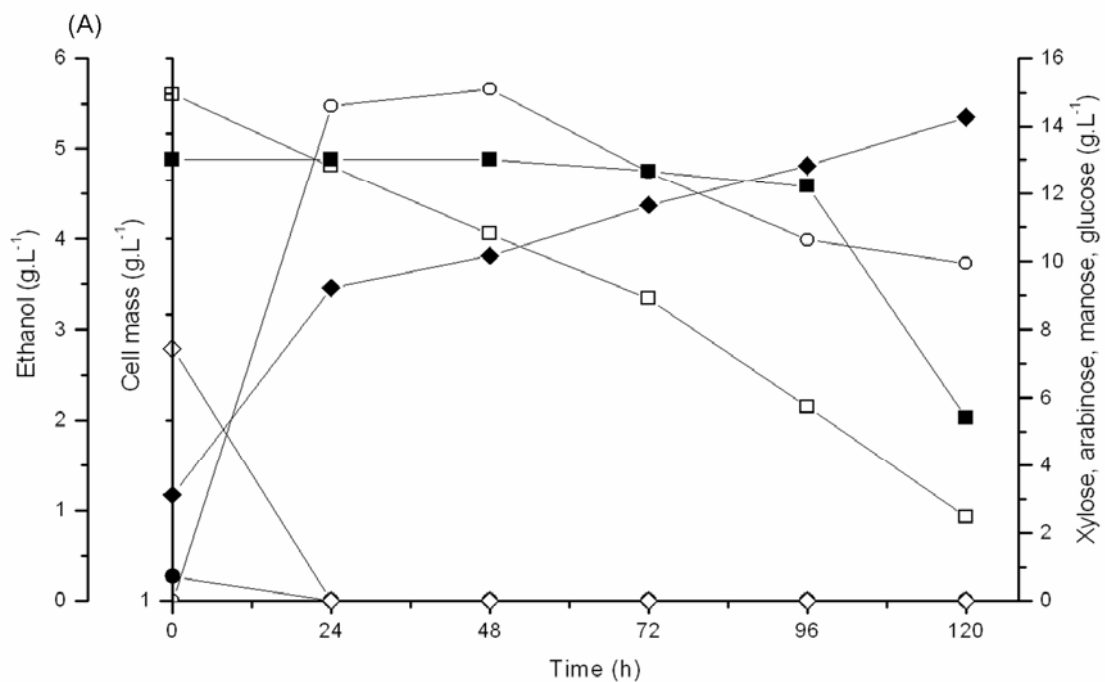


Fig. 3. Cultivation of *C. guilliermondii* in nondetoxified SHH-2C (A) and detoxified SHH-2C (B): cell mass (◆); ethanol (○); xylose (□); arabinose (■); manose (◇); glucose (●). Results are the mean of two experiments.

2.2 Resultados II – Effect of oxygen transfer rate on alcohols production from soybean hull hydrolysate

O segundo artigo intitulado “Effect of the oxygen transfer rate on alcohols production from soybean hull hydrolysate” avalia a utilização da xilose pela *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075 para formação de biomassa, etanol, xilitol e glicerol sob diferentes taxas de transferência de oxigênio. Este artigo será submetido ao periódico Biochemical Engineering Journal.

Effect of oxygen transfer rate on alcohols production from soybean hull hydrolysate

Ângela Cristina Schirmer-Michel, Simone Hickmann Flôres, Plinho Francisco Hertz,
Gilvane Souza Matos, Marco Antônio Záchia Ayub*

Food Science & Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul State,
Av. Bento Goncalves, 9500, PO Box 15090, ZC 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.

Abstract

In this research, we studied the use of soybean hull hydrolysate (SHH) as substrate for xylitol production using an osmotolerant strain of *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075. The production of xylitol was investigated in batch cultivations employing as variable parameter the oxygen volumetric mass transfer coefficient (k_{La}), evaluating three different conditions of aeration: anaerobic (150 rpm, no aeration); microaerobic (300 rpm, 1 vvm), and aerobic (600 rpm, 2 vvm), corresponding to k_{La} values of 0, 8 and 46 h^{-1} , respectively. SHH, although presenting a very high osmotic pressure (1,413 mOsm.kg⁻¹), was readily fermented under the aerobic condition with a biomass productivity of 0.23 g cells.(L.h)⁻¹, with little formation of ethanol. Xylitol was produced under microaeration, with $Y_{p/s}$ of 0.2 g.g⁻¹ and the formation of glycerol as by-product. Under anaerobic condition no xylose was metabolized. However, ethanol was produced from SHH hexoses with high yields of $Y_{p/s} = 0.5$ g.g⁻¹. These results suggest that the hydrolysis of soybean hull could be a useful technological prospect for this abundant agro-industrial waste of which hydrolysate could be directed for biofuel, xylitol or biomass production.

* Corresponding author. Phone: +55 51 3308 6685; Fax +55 51 3308 7048;
e-mail mazayub@ufrgs.br

Keywords: *Candida guilliermondii*; soybean hull; hydrolysate; xylitol; ethanol; glycerol; oxygen transfer rate.

1. Introduction

Xylitol is a naturally pentahydric sugar alcohol [1,2] which has attracted attention in the food and pharmaceutical industries due to its advantageous natural properties, such as natural sweetener of higher sweetening power, as sugar substitute in clinical diabetic foods, and as anticariogenic sweetener, which has been used for oral health and caries prevention. These properties make xylitol an important sugar substitute in wide variety of food and beverages [1-4].

Xylitol is currently produced in an industrial scale by a catalytic reduction (hydrogenation) of xylose derived mainly from wood hydrolysates [2]. However, drawbacks of this chemical process are the requirements of high pressure and temperature; the use of an expensive catalyst, and, specially, the use of extensive separation steps to remove the by-products from the hemicellulose fraction [4,5]. Therefore, the biotechnological production of xylitol using yeasts as biological models, growing on agro-industrial substrates such as sugar cane, has been explored as an effective alternative process [6]. Among the microorganisms, the yeasts are considered to be the best xylitol producers [7].

Lignocelluloses are the most abundant natural materials present on the earth and, regardless of source, lignocelluloses contain cellulose, hemicellulose and lignin as major components [8]. These materials, in the form of wastes, accumulate every year in large quantities, causing deterioration of the environment and loss of potentially valuable resources [9]. Hemicelluloses are heterogeneous polymers mainly composed of pentoses (xylose, arabinose) and hexoses (glucose, manose, galactose), from which xylose is the major

component [9,10], and their hydrolysates are been studied as culture media for xylitol and ethanol production [11].

Soybean (*Glycine max*) is the most cultivated plant worldwide, reaching 96.2 millions of hectares, resulting in 216.3 millions tons of grains per year [12]. Soy hulls represent the major by-product of soybean processing industry and constitute about 8 % of the whole seed [13]. According to these data, approximately 17.30 millions tons of soybean hull are produced every year. The insoluble carbohydrate fraction of soy hull cell walls consists of 30 % pectin, 50 % hemicellulose and 20 % cellulose [14]. This information reveals that soybean hulls are a great material to undergo hydrolysis and subsequent bioconversion to value added chemicals.

Biotechnological xylitol production is regulated by culture process parameters, such as pH, temperature, initial xylose concentration, presence of inhibitor compounds in the hydrolysate, and aeration [4,7,11]. Oxygen supply has the strongest effect on xylitol production because it interferes in the activities of xylose reductase and xylitol dehydrogenase enzymes involved in the xylose metabolism, determining whether biomass or xylitol will be accumulated [15,16]. Thus, the control of aeration, expressed as the oxygen volumetric mass transfer coefficient (k_La), is an important factor, which supplies vital information for the process scale-up [17,18].

The aim of this work was to study the xylose utilization for cell growth and alcohols (xylitol, ethanol, and glycerol) production on a high osmotic pressure soybean hull hydrolysate by *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075. Different k_La were evaluated in order to know whether xylitol could be produced from such complex hydrolysate medium.

2. Material and methods

2.1. *Microorganism, maintenance and inoculum*

Candida guilliermondii NRRL Y-2075 used in this study was maintained on YM agar slants containing (g.L⁻¹): yeast extract, 3; malt extract, 3; peptone, 5; glucose, 10; agar, 20. The medium used for inoculum contained (g.L⁻¹): yeast extract, 3; malt extract, 3; peptone, 5; glucose, 30. Glucose was autoclaved separately at 120 °C, 15 min. Inocula were prepared by cultivation of the yeast in 1000 mL Erlenmeyer flasks containing 200 mL of the medium. Cells were cultivated at 140 rpm, 30 °C for 24 h and were subsequently recovered by centrifugation (1,000 g, 10 min). The cell pellet was washed and suspended directly into the fermentation broth to reach an initial concentration of 1.5 g cells.L⁻¹.

2.2. *Soybean hull hydrolysate preparation*

Soybean hulls were supplied by The Solae Company (Esteio, Brazil). The hulls were milled to a particle size less than 1 mm in diameter. Acid hydrolysis of soybean hulls were carried out under optimized conditions (results not shown): temperature, 125 °C; sulphuric acid concentration, 1.4 % (v/v); solid/liquid ratio, 1/10; and reaction time, 1 h. After the hydrolysis, the remaining solid material was separated by filtration and the filtrate was stored at 4 °C. In order to increase the sugar content, the soybean hull hemicellulose hydrolysate (SHH) was concentrated under vacuum in a laboratory scale evaporator at 70 °C. The two-fold concentrated hydrolysate (SHH-2C) was treated prior to the fermentation for removing toxic compounds formed during hydrolysis. The SHH-2C was detoxified by adjustment of pH to 2.5 and subsequent addition of activated charcoal at a concentration of 10 % (w/v). The mixture was stirred in an orbital shaker at 140 rpm, 30 °C, for 1 h. The pH of treated SHH-2C was then corrected to 5.5 with NaOH pellets. The precipitate formed in each step was removed

by filtration. The treated hydrolysate was sterilized under 100 °C for 30 min. No supplementation was added to the hydrolysate.

2.3. Fermentation conditions

Fermentation runs were performed in a 2 L stirred-tank bioreactor (Biostat B model, B. Braun Biotech International, Germany) containing 1.3 L of hydrolysate. The fermenter was equipped with temperature, agitation, aeration and pH controllers and one Rushton turbine with six flat-blades. Dissolved oxygen level in the broth was measured using a polarographic electrode and was expressed as percentage of O₂ saturation. The temperature was maintained at 30 °C and the agitation and aeration rates were set at different values, characterizing three different oxygen transfer conditions: anaerobic (150 rpm, no aeration); microaerobic (300 rpm, 1 vvm); and aerobic (600 rpm, 2 vvm). The oxygen volumetric transfer coefficient, (k_{La}), was determined for the last two conditions. Samples were taken at 24 h time intervals to determine the concentrations of cell mass, residual sugars, xylitol, glycerol and ethanol in the broth. All experiments were carried out in duplicates.

2.4. Analytical methods

Monosaccharides (glucose, manose, xylose, and arabinose), xylitol and glycerol concentrations were determined by HPLC (Perkin Elmer Series 200, USA) with a refractive index (RI) detector and a Phenomenex RHM-monosaccharide column (300 mm x 7.8 mm), at 70 °C, using ultra pure water as eluent, flow of 0.6 mL/min and sample volume of 20 µL. Acetic acid and furfural content were measured using a gas chromatograph (CG-14B, Shimadzu, Japan) with a flame ionization detector (FID) and Carbowax column (60 m x 0.25 mm). Measures were carried out using nitrogen as gas carrier and n-propanol as the internal standard, the temperature of the detector and injection was 250 °C [19]. Ethanol concentration

was determined by gas chromatograph with a flame ionization detector (FID) and DB-1 column (30 m x 0.25 mm), n-propanol as internal standard. Phenolic compounds were measured spectrophotometrically using the Folin-Ciocalteu method according to Coseteng and Lee [20]. The osmotic pressure of hydrolysates was determined using Vapor Pressure Osmometer (Vapro 5520, USA). Biomass was quantified gravimetrically as dry weight of cells. Samples were centrifuged, washed twice with cold distilled water, and dried in pre-weighed plastic tubes at 80 °C to a constant weigh in vacuum-oven. The initial k_La was determined for each pair of conditions (aeration and stirring rates) using the dynamic gassing-out method [18]. k_La was estimated, according to Doran [21], in terms of oxygen solubility, using Equation 1, where k_La is the oxygen volumetric mass transfer coefficient (h^{-1}); C_L is the dissolved oxygen concentration in the bulk liquid phase ($mg.L^{-1}$); C_S is the dissolved oxygen saturation concentration ($mg.L^{-1}$); and t is time (h).

$$k_La = \frac{\ln\left(\frac{C_S - C_{L1}}{C_S - C_{L2}}\right)}{t_2 - t_1} \quad (1)$$

3. Results and discussion

3.1. Soybean hull hydrolysate composition

The basic composition of SHH employed in this work is shown on Table 1. The hydrolysis conditions used recovered, in the form of monosaccharides, 7.8 $g.L^{-1}$ xylose and 3.9 $g.L^{-1}$ manose. According to Stombaugh et al. [22], these values show that 76 % of hemicellulose from soybean hull have been hydrolyzed, liberating approximately, 85 and 62 % of the total xylose and manose, respectively. Xylose is the major component present in this hydrolysate, followed by another pentose, arabinose, which, according to Huisman et al. [23]

and Stombaugh et al. [22] is released from the side chain of pectin fraction of soybean hull cell wall polysaccharides.

According to Horitsu et al. [24], in batch process, both xylitol yield and production are favoured by high initial xylose concentrations. The concentration of hydrolysates by vacuum evaporation is a possible technology for sugar concentration. In preliminary assays, we tested four-fold concentrated soybean hull hydrolysate, containing 30 g.L^{-1} xylose (results not shown). However, this medium was unsuitable for fermentation due to its very high osmotic pressure ($2,948 \text{ mOsm.kg}^{-1}$), which impaired cell metabolism. According to Liu et al [25], an osmotic pressure of $2,108 \text{ mOsm.kg}^{-1}$ would stop cell growth of yeasts, even for osmophilic strains such as *C. krusei*. Thus, in the present work, the hydrolysate was two-fold concentrated (Table 1), for which the osmotic pressure was $1,413 \text{ mOsm.kg}^{-1}$, still high when compared with the synthetic medium (263 mOsm.kg^{-1}), but that could be readily used by the strain *C. guilliermondii* NRRL Y-2075. Results show that there was no sugar degradation and only a small increase in the content of acetic acid, whereas furfural and phenolic compounds were two-fold concentrated. Although the inhibitors content of the SHH-2C were below the critical values [26], the detoxification procedure was required before the hydrolysate could be employed as a fermentation medium to avoid possible synergistic effects of the toxic compounds [27]. The detoxification treatment with activated charcoal at 10 % (w/v) concentration eliminated furfural and promoted a reduction of 85 % of phenolic compounds, and 65 % of acetic acid (Table 1).

3.2. Batch cultivations on soybean hull hydrolysate

In Table 2 we present the results of the oxygen transfer rate (k_{La}) for different conditions of aeration and agitation speed in SHH-2C medium. The oxygen volumetric mass transfer coefficient of bioreactors is markedly dependent on media composition employed

[28]. Under the conditions of this research, 300 rpm and 1 vvm produced a k_{La} of 8 h^{-1} , while 600 rpm and 2 vvm resulted in k_{La} of 46 h^{-1} . These values are somewhat lower than those assigned to other hydrolysates of agro-industrial residues. For instance, Roberto et al. [28], found a k_{La} of 15 h^{-1} for concentrated rice straw hydrolysate containing 120 g.L^{-1} of xylose under aeration of 1.3 vvm and 300 rpm agitation speed in a bench bioreactor. Furlan et al. [15], working with synthetic medium containing 50 g.L^{-1} xylose, measured a k_{La} of 99.6 h^{-1} under 0.6 vvm and 500 rpm. These results suggest that oxygen transfer rates in soybean hull hydrolysate are lower than those observed for other hydrolysates. As can be seen in Table 2, the oxygen supply considerably affected cell growth, substrate consumption, and product formation.

Figure 1 shows that, under anaerobic conditions, *C. guilliermondii* grew poorly, until 24 h of cultivation, reaching $2.37 \text{ g cell.L}^{-1}$. The same growth kinetic was observed for *C. boidini* under anaerobiosis in synthetic medium [16]. Only the hexoses - manose and glucose - were assimilated, very slowly, to a consumption rate of $0.1 \text{ g sugars.(L.h)}^{-1}$. The biomass productivity achieved under this condition was $0.04 \text{ g cells.(L.h)}^{-1}$ compared with $0.23 \text{ g cells.(L.h)}^{-1}$ reached with k_{La} of 46 h^{-1} (Table 2). No xylose was metabolized by *C. guilliermondii* under anaerobic conditions. The same behaviour was observed by Furlan et al. [15], cultivating *C. parapsilosis* in a synthetic media (50 g.L^{-1} xylose) under anaerobic conditions. According to Barnett [29], most yeasts are not able to metabolize D-xylose anaerobically due to the Kluyver effect. But most important of our results, is that ethanol was produced from hexoses (manose and glucose) achieving a high $Y_{p/s}$ of $0.5 \text{ g ethanol.g}^{-1}$ substrate (hexoses), during the first 12 h cultivation.

Under the microaerobic conditions tested (k_{La} of 8 h^{-1}), *C. guilliermondii* was able to produce xylitol from a SHH-2C without any supplementation. Kinetic profiles of cell growth, monosaccharides consumption, and product formation by *C. guilliermondii*, at k_{La} of

8 h⁻¹, are depicted in Figure 2. The hexoses were consumed first, followed by xylose. This preferential order for monosaccharides consumption has been showed by Parajó et al. [30]. Arabinose was not consumed during the cultivation run. The cultivation showed a diauxic kinetic, with the different monosaccharides and ethanol consumption. During the first 12 h, the hexoses were completely depleted and the maximum ethanol concentration was achieved with a relatively high yield ($Y_{p/s}$ 0.4 g ethanol.g⁻¹ sugar). After that, ethanol and xylose were metabolized. This phenomenon was also observed by Guo et al. [31] employing a wild type *C. maltosa* Xu316 cultured in YSC-xylose (50 g.L⁻¹) medium. According to these authors, xylose conversion to ethanol continues until the residual xylose concentration is around 10 g.L⁻¹, when cells began consuming the ethanol formed in the first phase. The inability of the yeast to convert xylose to ethanol at residual xylose levels (10 g.L⁻¹ = 65 mM) is likely to be due to a limitation in xylose transport [32]. As can be seen in Figure 2, the xylitol production occurred under oxygen limitation (pO₂ = 0 %). This can be explained by the fact that, under oxygen limitations, the electron transfer system of yeasts becomes unable to completely regenerate NAD⁺ from NADH produced from the first step of xylose metabolism. The increase in NADH concentration blocks the subsequent metabolism reactions and allows xylitol excretion to culture medium [7]. The yields for xylitol production ($Y_{p/s}$) obtained in the present work, for k_{La} of 8 h⁻¹, was 0.2 g xylitol.g⁻¹ xylose, whereas Winkelhausen et al. [16], using *C. boidini* achieved, for the same k_{La} value, 0.16 g.g⁻¹ employing synthetic medium, which is free from inhibitor compounds, and with xylose concentration four times higher than that used in our work. However, the k_{La} value of 8 h⁻¹ employed in the present work as well the xylitol yield appear to be low when compared with that published in other works employing hydrolysates and *C. guilliermondii*, where higher concentrations of xylose were metabolized under higher coefficients of oxygen mass transfer [28,33,34]. According to Horitsu et al. [24], there is a relation between the oxygen transfer coefficient and substrate

concentration as well as the positive influence of the amount of xylose on xylitol yield and productivity. Besides, the presence of hexoses, glucose and manose, in SHH-2C, can affect the xylose metabolism and, subsequent xylitol yield, by a partial inhibition of transport systems or catabolic enzymes [35]. Figure 2 shows the glycerol production coupled with the pO_2 drop, since glycerol production acts as a redox sink for excess NADH [36].

Figure 3 shows the kinetics of *C. guilliermondii* NRRL Y-2075 growing in SHH-2C under fully aerobic conditions (600 rpm, 2 vvm, k_{La} of 46 h^{-1}). Monosaccharides were almost completely exhausted in 48 h, presenting the same sugar order consumption that the microaerobic condition except for arabinose, which was completely depleted under the aerobic condition. Higher amounts of biomass ($28.8\text{ g cell.L}^{-1}$) were obtained, whereas all product yields decreased, when compared to the cultivation under microaerobic conditions (k_{La} of 8 h^{-1}) (Table 2). However, no xylitol was produced. These might be explained by the fact that the oxygen supply was higher than the cell demand during cultivation. The high oxygen supply promotes the complete oxidization of NADH through the respiratory chain, employing the oxygen as the final electron acceptor, recovering NAD^+ [37]. The high $NAD^+/NADH$ relation obtained under this aeration level favours xylitol oxidation to xylulose, promoting cell growth and no xylitol accumulation [38].

4. Conclusions

The present study is the first report on the biotechnological potential of soybean hull hydrolysates, especially for the production of ethanol. We also showed a particularly important feature of *C. guilliermondii* NRRL Y-2075 that is its ability to grow and to ferment sugars to ethanol, and possibly xylitol, in highly osmotic media. Under anaerobic conditions, ethanol was produced with high yield ($Y_{x/s}$ of $0.5\text{ g ethanol. g}^{-1}\text{hexoses}$). Our results also suggest that oxygen supply was a key factor controlling the bioconversion of xylose to xylitol

or biomass. In aerobic conditions cell growth is high, whereas in limited oxygen conditions a large part of xylose utilized is converted into xylitol. Therefore, SHH-2C might be used as culture medium, without supplementation and detoxified by simple and inexpensive treatment, for xylitol production under limited oxygen conditions. However, further studies are granted to better define the ideal conditions of aeration and its relation with xylose concentration in order to improve xylitol production, which was low in our work. These results show the great prospect for the use of soybean hull, an important world agro-industrial waste, for xylitol, biomass or biofuel production.

Acknowledgments

The authors wish to thank CAPES for scholarships and CNPq for the financial support of this work.

References

- [1] A. Emodi, Xylitol, its properties and food applications, *Food Technol.* 32 (1978) 20-32.
- [2] L. Hyvönen, P. Koivistoinen, F. Voirol, Food technological evaluation of xylitol, *Adv. Food Res.* 28 (1982) 373-403.
- [3] T. Pepper, M. Olinger, Xylitol in sugar-free confections, *Food Technol.* 10 (1988) 98-106.
- [4] P. Nigam, D. Singh, Processes for fermentative production of xylitol – a sugar substitute, *Process Biochem.* 30 (2) (1995) 117-124.
- [5] B.C.Saha, R.J. Bothast, Production of xylitol by *Candida peltata*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 22 (1999) 633-636.
- [6] K. Tada, J.I. Horiuchi, T. Kanno, M. Kobayashi, Microbial xylitol production from corn cobs using *Candida magnoliae*, *J. Biosci. Bioeng.* 98 (3) (2004) 228-230.
- [7] E. Winkelhausen, S. Kuzmanova, Microbial conversion of D-xylose to xylitol, *J. Ferment. Bioeng.* 86 (1) (1998) 1-14.
- [8] P. Gosh, A. Singh, Physicochemical and biological treatment for enzymatic/microbial conversion of lignocellulosic biomass, *Adv. Appl. Microbiol.* 39 (1993) 293-333.
- [9] R.C. Kuhad, A. Singh, Lignocellulose biotechnology: current and future prospects, *Crit. Rev. Biotechnol.* 13 (2) (1993) 151-172.
- [10] T.W. Jeffries, Y. Jin, Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts, *Adv. Appl. Microbiol.* 47 (2000) 221-268.
- [11] J.C. Parajó, H. Domínguez, J.M. Dominguez, Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates, *Bioresour. Technol.* 66 (1998a) 25-40.

- [12] United States Department of Agriculture (USDA). September, 2006. Foreign Agriculture Service – Production, Supply and Distribution Online. Oilseeds. Retrieved from: <http://www.fas.usda.gov/psdonline>.
- [13] R. Gnanasambandan, A. Proctor, Preparation of soy hull pectin, *Food Chem*, 65 (1999) 461-467.
- [14] H.E. Snyder, T.W. Kwon, Soybean utilization. Van Nostrand Reinhold, New York (1987) p.60.
- [15] S.A. Furlan, P. Bouilloud, H.F. Castro, Influence of oxygen on ethanol and xylitol production by xylose fermenting yeasts, *Process Biochem*. 29 (1994) 657-662.
- [16] E. Winkelhausen, S.A. Amartei, S. Kuzmanova, Xylitol production from D-xylose at different oxygen transfer coefficients in a batch bioreactor, *Eng. Life Sci*. 4 (2) (2004) 150-154.
- [17] J.L.C. López, E.M.R. Porcel, I.O. Alberola, M.M.B. Martin, J.A.S Pérez, J.M.F. Sevilla, Y. Chisti, Simultaneous determination of oxygen consumption rate and volumetric oxygen transfer coefficient in pneumatically agitated bioreactors, *Ind. Eng. Chem. Res*. 45 (2006) 1167-1171.
- [18] K. Pouliot, J. Thibault, A. Garnier, G.A. Leiva, K_{La} evaluation during the course of fermentation using data reconciliation techniques, *Bioprocess Eng*. 23 (2000) 565-573.
- [19] P.T. William, J. Onwudili, Composition of products from the supercritical water gasification of glucose: a model biomass compound, *Ind. Eng. Chem. Res*. 44 (2005) 8739-3749.
- [20] M.Y. Coseteng, C. Lee, Changes in apple polyphenoloxidase and polyphenol concentrations in relation to degree of browning, *J. Food Sci*. 52 (4) (1987) 985-989.
- [21] P.M Doran, Mass transfer, in: P.M Doran, *Bioprocess Engineering Principles*. Academic Press Limited, London (2000) pp.190-217.

- [22] S.K. Stombaugh, H.G. Jung, J.H. Orf, D.A. Somers, Genotypic and environmental variation in soybean seed cell wall polysaccharides, *Crop Physiol. Metabolism*. 40 (2000) 408-412.
- [23] M.M.H. Huismann, H.A. Schols, A.G.J. Voragen, Cell wall polysaccharides from soybean (*Glycine max.*) meal. Isolation and characterization, *Carbohydr. Polym.* 37 (1998) 87-95.
- [24] H. Horitsu, Y. Yahashi, K. Takamizawa, K. Kawai, T. Suzuki, N. Watanabe, Production of xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis*: optimization of production rate, *Biotechnol. Bioeng.* 40 (1992) 1085-1091.
- [25] H.J. Liu, D.H. Liu, J.J. Zhong, Quantitative response of trehalose and glycerol syntheses by *Candida krusei* to osmotic stress of the medium, *Process Biochem.* 41 (2006) 473-476.
- [26] S.I. Mussatto, I.C. Roberto, Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolysates for use in fermentative processes: a review, *Bioresour. Technol.* 93 (2004a) 1-10.
- [27] L. Preziosi-Belloy, V. Nolleau, J.M. Navarro, Fermentation of hemicellulosic sugars and sugars mixtures to xylitol by *Candida parapsolis*, *Enzyme Microb. Technol.* 21 (1997) 124-129.
- [28] I.C. Roberto, I.M. Mancilha, S. Sato, Influence of k_{La} on bioconversion of rice straw hemicellulose hydrolysate to xylitol, *Bioprocess Eng.* 21 (1999) 505-508.
- [29] J.A. Barnett, The utilization of sugar by yeasts, *Adv. Chem. Biochem.* 32 (1976) 125-234.
- [30] J.C. Parajó, H. Domínguez, J.M. Domínguez, Biotechnological production of xylitol. Part 2: Operation in culture media made with commercial sugars, *Bioresour. Technol.* 65 (1998b) 203-212.

- [31] C. Guo, P. He, D. Lu, A. Shen, N. Jiang, Cloning and molecular characterization of a gene coding D-xylulokinase (*CmXYL3*) from *Candida maltosa*, J. Appl. Microbiol. 101 (2006) 139-150.
- [32] M.H Toivari, A. Aristidou, L. Ruohonen, M. Penttillä, Conversion of xylose to ethanol by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*: Importance of xylulokinase (*XKSI*) and oxygen viability, Metabolic Eng. 3 (2001) 236-249.
- [33] S.S Silva, J.D Ribeiro, M.G.A. Felipe, M. Vitolo, Maximizing the xylitol production from sugar cane bagasse hydrolysate by controlling the aeration rate, Appl. Biochem. Biotechnol. 63-65 (1997) 557-564.
- [34] S.I Mussatto, I.C. Roberto, Kinetic behavior of *Candida guilliermondii* yeast during xylitol production from highly concentrated hydrolysate, Process Biochem. 39 (2004b) 1433-1439.
- [35] S.R. Webb, H. Lee, Regulation of D-xylose utilization by hexoses in pentose-fermenting yeasts, Biotech. Adv. 8 (1990) 685-697.
- [36] T. Granström, H. Ojamo, M. Leisola, Chemostat study of xylitol production by *Candida guilliermondii*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 55 (2001) 36-42.
- [37] E.N. Yablochkova, O.I Bolotnikova, N.P. Mikhailova, N.N. Nemova, A.I Ginak, The activity of key enzymes in xylose-assimilating yeasts at different rates of oxygen transfer to the fermentation medium, Microbiol. 73 (2) (2004) 129-133.
- [38] E.A. Martinez, S.S. Silva, J.B. Almeida e Silva, A.I.N. Solenzal, M.G.A. Felipe, The influence of pH on dilution rate on continuous production of xylitol from sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *C. guilliermondii*, Process Biochem. 38 (2003) 1677-1683.

Table 1. Composition of SHH, nondetoxified and detoxified SHH-2C with activated charcoal 10 % (w/v) and pH adjusted to 5.5.

Compound (g.L ⁻¹)	SHH	Nondetoxified	Detoxified
		SHH-2C	SHH-2C
Xylose	7.8	14.5	13.3
Arabinose	6.5	12.0	11.1
Manose	3.9	7.2	6.7
Glucose	0.8	1.4	1.3
Furfural	0.3	0.6	0
Acetic acid	1.0	1.1	0.4
Phenol compounds	0.8	1.5	0.2

Table 2. k_{La} values determined for each pair of aeration and stirring rates and the kinetic parameters for *Candida guilliermondii* tested under these oxygen conditions.

Stirring rate (rpm)	Aeration rate (vvm)	k_{La} (h^{-1})	Biomass		Ethanol		Xylitol	
			t_f	Q_s	t_f	$Y_{p/st}$	t_f	$Y_{p/s}$
	Anaerobic*	0	24	0.04	12	0.5	Not detected	
300	1	8	120	0.07	24	0.4	120	0.2
600	2	46	48	0.23	12	0.2	Not detected	

t_f , time required for the maximum product concentration to be reached; Q_s , biomass productivity ($g.(L.h)^{-1}$); $Y_{p/s}$, product yield ($g.g^{-1}$); s, substrate (xylose); st, total substrate (glucose, manose, xylose, arabinose); p, product (ethanol or xylitol).

*In anaerobic condition medium was stirred at 150 rpm for homogeneity.

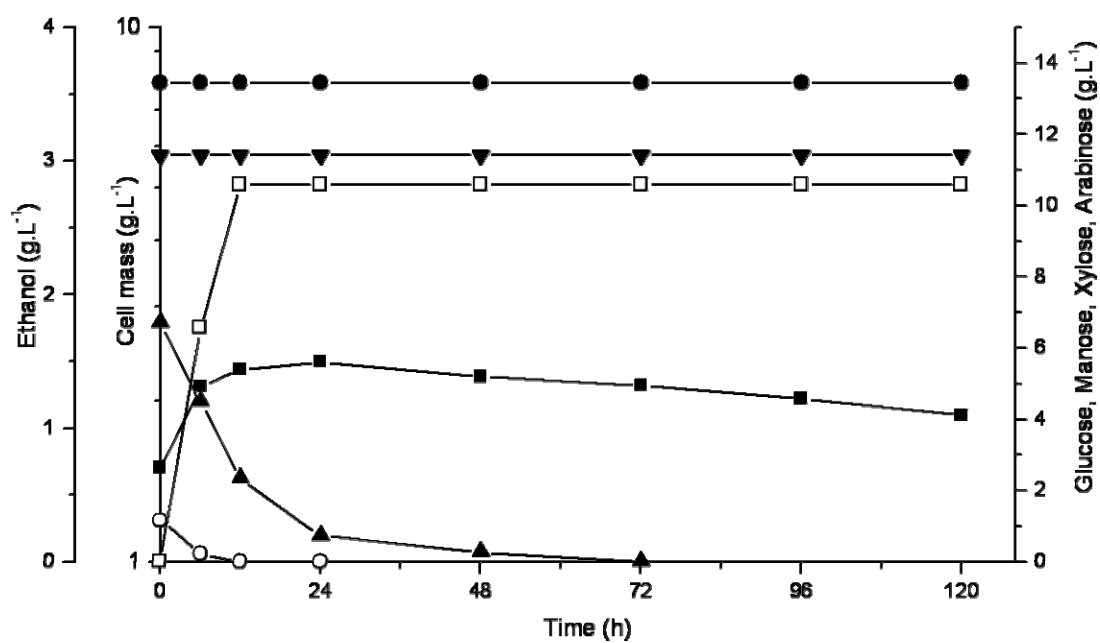


Fig. 1. Cultivation of *C. guilliermondii* in detoxified SHH-2C under anaerobic conditions. Plot of cell mass (■); ethanol (□); glucose (○); manose (▲); xylose (●); arabinose (▼). Results are the mean of two experiments.

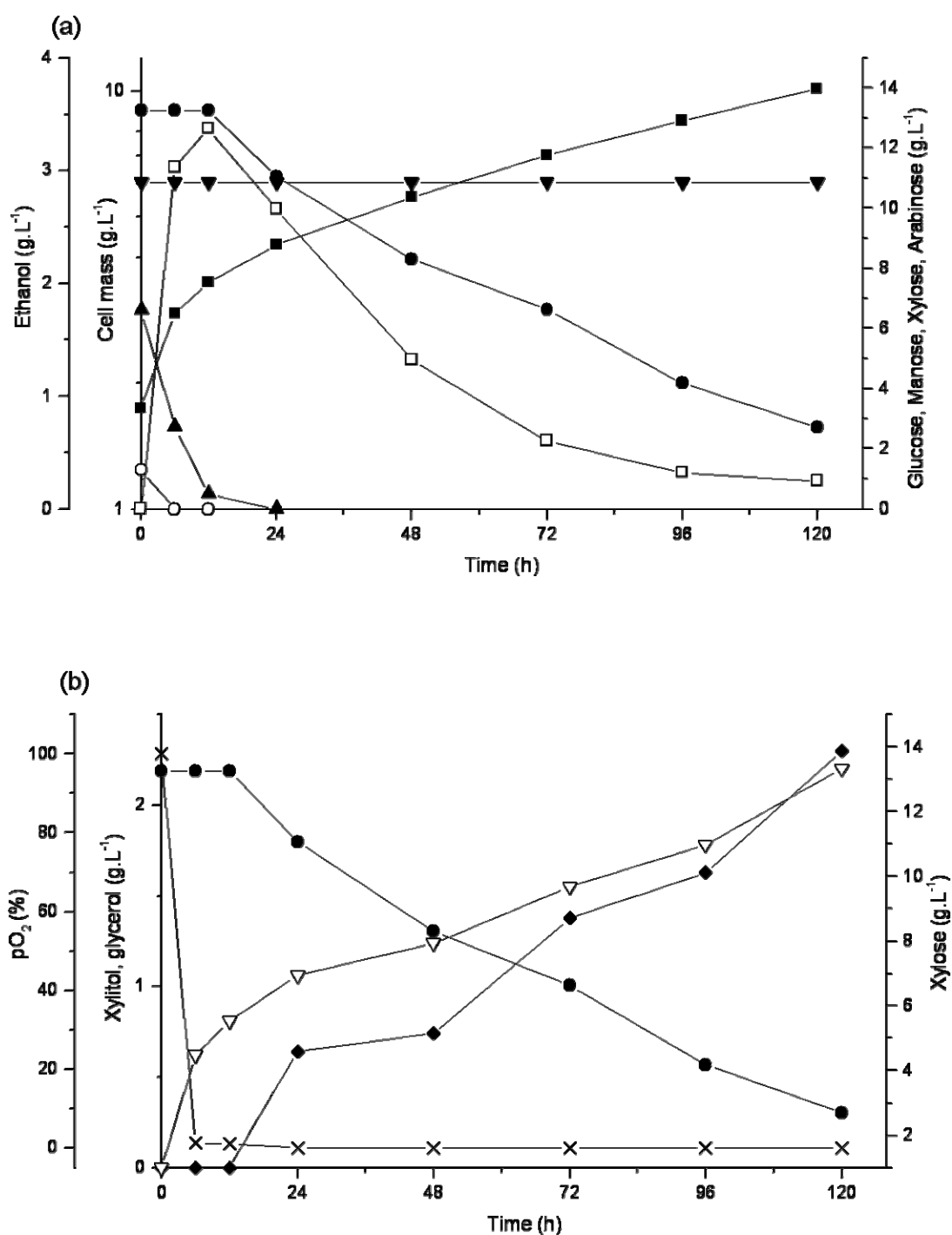


Fig. 2. Cultivation of *C. guilliermondii* in detoxified SHH-2C under microaerobic conditions (kLa value of 8 h⁻¹): (a) Plot of cell mass (■); ethanol (□); glucose (○); manose (▲); xylose (●); arabinose (▼); (b) Plot of xylose (●); xylitol (◆); glycerol (▽); pO₂ (×). Results are the mean of two experiments.

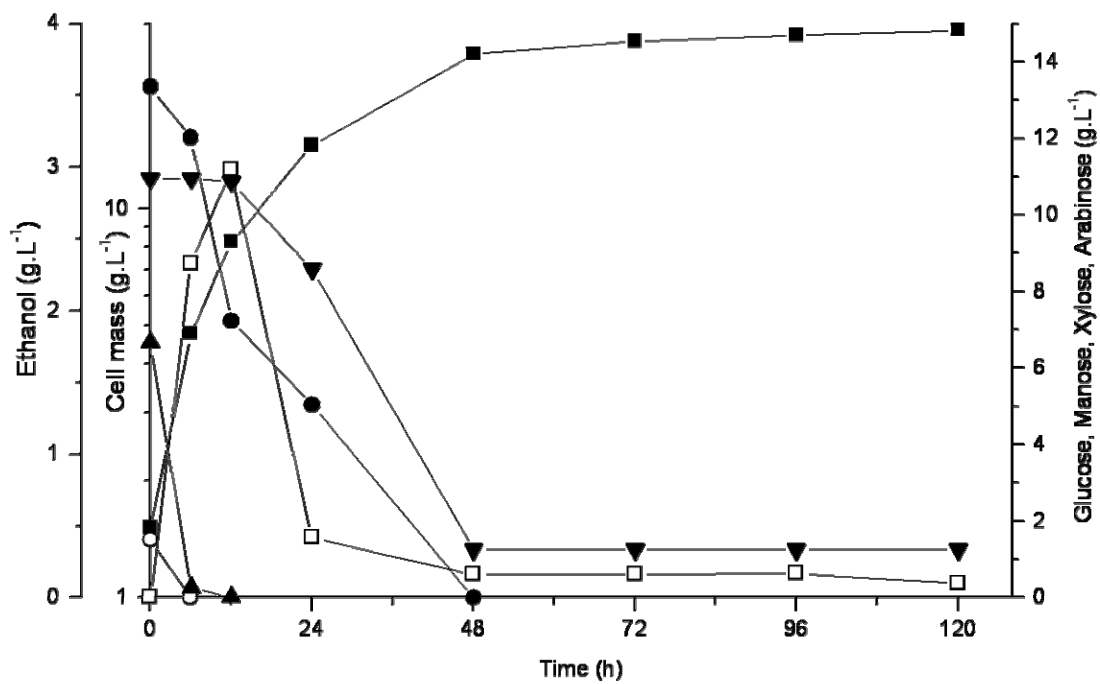


Fig. 3. Cultivation of *C. guilliermondii* in detoxified SHH-2C under aerobic conditions (kLa value of 46 h⁻¹): Plot of cell mass (■); ethanol (□); glucose (○); manose (▲); xylose (●); arabinose (▼). Results are the mean of two experiments.

3 DISCUSSÃO GERAL

Neste trabalho foi abordado o potencial biotecnológico da utilização do hidrolisado de casca de soja para produção de combustível (etanol), biomassa, ou xilitol, conhecimento este até então inédito na literatura. Além de ampliar os conhecimentos no tocante à produção biotecnológica de álcoois mediante o cultivo de *C. guilliermondii* sobre hidrolisado de casca de soja, o presente trabalho abordou a influência decisiva do coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio na produção de etanol, xilitol ou biomassa.

Em um primeiro momento, o presente trabalho restringiu-se à elaboração do hidrolisado de casca de soja, mediante hidrólise ácida diluída. De acordo com os dados apresentados no primeiro artigo “Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075”, a hidrólise de casca de soja empregando 125 °C, ácido sulfúrico 1,4 % (v/v), relação sólido líquido 1/10, durante 1 h, condição mais drástica testada, foi eficiente, hidrolisando cerca de 76 % da hemicelulose desse resíduo, liberando na forma de monossacarídeos 85 % da xilose e 62 % da manose. Nesse caso, a otimização do processo de hidrólise empregando ferramentas estatísticas torna-se desnecessária devido a uma série de fatores. Primeiro, o presente experimento indica que quanto maior a temperatura e a concentração ácida empregadas maior será a recuperação dos açúcares em sua forma monomérica. Entretanto, esses parâmetros, temperatura e concentração do ácido, não podem ser aumentados posto que, para concentrações maiores de ácido sulfúrico utilizada, o processo perde seu caráter de hidrólise ácida diluída, requerendo equipamentos especiais e tornando o processo mais oneroso. Quanto à temperatura, o fator limitante consiste na capacidade do equipamento utilizado, neste caso autoclave. Além disso, a recuperação em forma de monossacarídeos da xilose, açúcar de interesse para bioconversão a xilitol e etanol, foi elevada, de forma que o aumento da temperatura e concentração do ácido implicaria em maior degradação de pentoses e hexoses e conseqüente formação de furfural e hidroximetilfurfural.

Embora a hidrólise tenha sido eficiente, do ponto de vista de recuperação da xilose, a concentração dessa pentose no hidrolisado é, relativamente, baixa quando comparada a outros hidrolisados. Carvalheiro et al. (2005) obtiveram 14,9 g.L⁻¹ de xilose em hidrolisado de resíduo de malte de cervejaria; Silva et al. (1997) atingiram 26,39 g.L⁻¹ em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar; e mediante a hidrólise de palha de arroz, Roberto, Mancilha e Sato (1999), obtiveram um hidrolisado com 16,44 g.L⁻¹ de xilose. Esses resultados foram obtidos

empregando-se equipamentos específicos, tais como, reator de hidrólise, o qual atinge elevadas temperaturas.

Além disso, no tocante a utilização de resíduos agroindustriais, os quais representam muitas vezes problemas de cunho ambiental às indústrias processadoras, deve-se levar em conta, não apenas a quantidade de xilose liberada pelo substrato mediante a hidrólise, mas também, a quantidade desse resíduo gerado diariamente, bem como, o destino comumente dado aos mesmos. Assim, a utilização de bagaço de cana-de-açúcar nas caldeiras pelas próprias indústrias sucro-alcooleiras representam um destino mais nobre ao que é dado às cascas de soja, normalmente empregadas como suplemento de ração animal. Deve-se também ressaltar que, a alta concentração de açúcares nos referidos meios promove maior formação de compostos inibidores o que exige eficientes tratamentos de detoxificação tornando o processo mais oneroso e complexo.

Nesse sentido, o tratamento de detoxificação desenvolvido nesse trabalho, utilizando apenas ajuste de pH mediante adição de NaOH e carvão ativado demonstrou ser suficiente para remoção significativa dos contaminantes do hidrolisado de casca de soja. O tratamento desenvolvido, entre outros itens, minimiza a perda de hidrolisado e o tempo de processo, além de diminuir os gastos, substituindo $\text{Ca}(\text{OH})_2$, correntemente utilizado, por NaOH. Segundo Gurgel et al. (1998), a baixa solubilidade do $\text{Ca}(\text{OH})_2$ aumenta a torta de filtração, retendo mais hidrolisado por capilaridade, aumentando significativamente o tempo de processo e reduzindo a quantidade de filtrado recuperado. O tratamento de detoxificação desenvolvido no presente trabalho diferencia-se dos demais pela redução do número de etapas de correção de pH, filtração a vácuo e centrifugações, garantindo, mesmo assim, elevado grau de remoção dos inibidores.

Deve-se ressaltar que os índices de remoção de compostos inibidores mediante tratamento com carvão ativado 10 % (p/v), apresentados no primeiro artigo científico (item 2.1), empregando-se hidrolisado de casca de soja quatro vezes concentrado (SHH-4C) são menores do que aqueles apresentados no segundo artigo (item 2.2), empregando-se hidrolisado de casca de soja duas vezes concentrado (SHH-2C). Esse resultado era esperado, pois para ambos os hidrolisados foi empregado a mesma concentração de carvão ativado (10 % (p/v)) mas a concentração inicial dos inibidores no SHH-2C é inferior a do SHH-4C e existe uma relação entre a quantidade de carvão e a quantidade de inibidores removida. Isso porque as superfícies das partículas do carvão são progressivamente bloqueadas pelos compostos inibidores, tornando-se totalmente cobertas (MUSSATTO; ROBERTO, 2004b).

Então, mantendo-se a quantidade de carvão ativado e diminuindo-se a concentração inicial de inibidores aumenta-se o índice (expresso em percentual) de remoção dos mesmos.

Os cultivos realizados em SHH-4C e SHH-2C, apresentados no artigo “Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075” levaram à descoberta de que a levedura empregada, *C. guilliermondii* NRRL Y-2075, é osmotolerante, dada sua elevada viabilidade celular frente à alta pressão osmótica do hidrolisado. A elevada pressão osmótica implicou em baixa solubilidade de oxigênio, dado esse verificado por medidas de coeficiente de transferência de oxigênio em meio sintético e hidrolisado, promovendo uma condição de aeração muito restrita para os cultivos realizados em SHH. Dadas essas condições, o cultivo de *C. guilliermondii* em hidrolisado resultou na produção de etanol, sem formação de xilitol. Entretanto, segundo Granström, Ojamo e Leisola (2001) a levedura *C. guilliermondii* apresenta predominantemente xilose redutase NADPH-dependente o que indica tendência à formação de xilitol pela metabolização da xilose, exceto sob condições de grande aeração. Mas, esses mesmos pesquisadores indicam a possibilidade de que o aumento no acúmulo de NADH, devido a condições muito restritas de oxigênio, pode inibir a atividade da xilose redutase NADPH-dependente, além de modificar a preferência da dependência do cofator de NADPH para NADH. Essa modificação resulta na formação de NAD⁺ mediante a redução da xilose, recuperando o cofator da xilitol desidrogenase, permitindo a fermentação da xilose a etanol. As enzimas xilose redutases NADPH-dependente de leveduras, como *C. guilliermondii*, ou NADH-dependente, como *P. stipitis*, apresentam idêntico número de resíduos de cisteína, em mesmas localizações, entretanto, a xilose redutase da *C. guilliermondii* apresenta um resíduo de histidina adicional (HANDUMRONGKUL et al., 1998). Esse fator pode contribuir para a preferência de NADPH como cofator da enzima xilose redutase da *C. guilliermondii* (GRANSTRÖM; OJAMO; LEISOLA, 2001).

Os resultados referentes aos cultivos em SHH-2C detoxificado e não-detoxificado revelaram que, embora os níveis dos compostos tóxicos estivessem abaixo dos limites críticos apresentados pela bibliografia, o hidrolisado detoxificado apresentou formação de biomassa 30 % superior ao não detoxificado, e maior rendimento na produção de etanol. Com base nesses resultados os demais experimentos foram todos realizados com SHH-2C detoxificado.

A possibilidade de formação de xilitol a partir de hidrolisado de casca de soja foi verificada através dos ensaios apresentados no artigo “Effect of the oxygen transfer rate on alcohols production from soybean hull hydrolysate”. Os resultados desse trabalho confirmam a baixa transferência de oxigênio do SHH, corroborando ainda mais aos resultados descritos

anteriormente. Além disso, esses resultados ratificam a possibilidade de produção de xilitol a partir desse hidrolisado, desde que condições limitadas de oxigênio sejam empregadas sob o controle do coeficiente de transferência de oxigênio (k_{La} de 8 h^{-1}). Diferentemente dos resultados obtidos em meio sintético, o cultivo da *C. guilliermondii* em SHH-2C não apresentou consumo do xilitol formado, mesmo que a concentração de xilose tenha atingido valores críticos. Segundo Carvalho et al. (2005), isso se deve a presença de arabinose. Essa pentose foi metabolizada dentro do tempo de cultivo estipulado (120 h) apenas quando condições aeradas foram aplicadas, revelando a capacidade da levedura em metabolizar essa pentose, raramente consumida por outros microrganismos. Além disso, os resultados obtidos através dos ensaios realizados em condições aeróbias (k_{La} de 46 h^{-1}), revelaram a ótima fermentabilidade desse meio, dado o elevado índice de rendimento de biomassa, comprovando, assim, a baixa concentração de inibidores.

A produção de etanol sob as três condições de aeração testadas no segundo artigo (anaeróbia, microeróbia e aeróbia) ocorreu com base no consumo das hexoses, confirmando que a produção de etanol a partir de xilose pela *C. guilliermondii* não ocorre em condições anóxicas e, sim, em condições de oxigênio muito estritas de forma a acumular NADH.

Enfim, os resultados apresentados indicam que hidrolisado de casca de soja pode ser empregado como meio de cultura sem nenhuma suplementação e detoxificado por um tratamento simples e de baixo custo, podendo ser o mesmo concentrado a fim de aumentar as concentrações iniciais dos açúcares.

Em conclusão, é importante se ressaltar o grande potencial energético desse resíduo agroindustrial, gerado diariamente em grandes quantidades em todo mundo, que é a casca de soja, mediante a obtenção de seu hidrolisado ácido cuja bioconversão pode ser direcionada a produção de etanol, xilitol, ou biomassa, dependendo do grau de aeração empregado.

PERSPECTIVAS

O presente trabalho demonstrou a possibilidade da utilização biotecnológica de casca de soja, mediante processos de hidrólise e detoxificação simplificados e de baixo custo, para produção de etanol, xilitol e biomassa, abrindo possibilidades de novos projetos e linhas de pesquisa.

Os resultados obtidos no presente trabalho podem ser otimizados, determinando-se as condições de aeração e agitação adequadas para se atingir um coeficiente volumétrico de transferência de oxigênio ótimo para uma maior bioconversão de xilose a xilitol, com base na concentração inicial de xilose do hidrolisado de casca de soja. O aumento no rendimento de xilose a xilitol ainda pode ser testado aumentando-se a concentração inicial de células e promovendo-se a adaptação da levedura ao hidrolisado, diminuindo, assim, os efeitos relativos aos inibidores e pressão osmótica.

No tocante a produção de etanol, o melhoramento no aproveitamento da xilose do SHH na conversão a etanol também configura como perspectiva, possibilitando a utilização de leveduras reconhecidamente produtoras de etanol a partir de xilose como *P. stipis* ou *S. cerevisiae* geneticamente modificada.

Outra perspectiva aberta por esse trabalho consiste na avaliação de consórcio de leveduras para a produção de xilitol tanto em meio sintético como SHH, assim, como a utilização de mistura de hidrolisados de diferentes substratos de forma a aumentar a concentração inicial dos açúcares, especialmente, xilose, sem aumentar a pressão osmótica do meio. Deve-se ressaltar ainda, a possibilidade do melhoramento do processo de detoxificação do SHH, avaliando-se outras técnicas e buscando mecanismos para diminuição de sua pressão osmótica.

Este trabalho ainda alça perspectivas da utilização do hidrolisado de casca de soja como meio de cultivo para produção de outros metabólitos de elevado valor agregado dado sua excelente fermentabilidade e baixo custo de produção, além de propiciar destino a um resíduo de grandes proporções atuais.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C.L.; OETTERER, M.; MENEZES, T.J.B. Caracterização e aplicações do xilitol na indústria alimentícia. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.33, n.2, p.184 – 193, jul/dez 1999.
- BARBOSA, M.F.S. et al. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology**, Amsterdam, v.3, n.4, p. 241 – 251, 1988.
- BOTHAST, R.J.; SAHA, B.C. Ethanol production from agricultural biomass substrates. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v.44, p.261-286, 1997.
- BRUINENBERG, P.M. et al. NADH-linked aldose reductase: the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.19, p.256-260, 1984.
- CARVALHEIRO, F. et al. Evaluation of the detoxification of brewery's spent grain hydrolysate for xylitol production by *Debaryomyces hansenii* CCMI 941. **Process Biochemistry**, London, v.40, p.1215-1223, 2005.
- CHADAKANT, P.; BISARIA, V.S. Simultaneous bioconversion of cellulose and hemicellulose to ethanol. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v.18, n.4, p.295-331, 1998.
- COUNSELL, J.N.; ROBERTON, D.J. Xylitol. A sweetener which is kind to the teeth. **Food Processing Industry**, London, v.5, n.540, p.23 – 26, 1976.
- DU PREEZ, J.C.; VAN DRIESSEL, B.; PRIOR, B.A. Effect of aerobiosis on fermentation and key enzyme levels during growth of *Pichia stipitis*, *Candida shehatae*, and *Candida tenuis* on D-xylose. **Archives of Microbiology**, Berlin, v.152, p.143-147, 1989.
- EMBRAPA. Embrapa Soja. **Dados econômicos**. Londrina, 2006. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/index>>. Acesso em: 12 dez. 2006.
- EMODI, A. Xylitol. Its properties and food applications. **Food Technology**, Chicago, v.32, n.1, p.28 – 32, 1978.
- FELIPE, M.G.A. et al. Effect of acetic acid on xylose fermentation by *Candida guilliermondii*. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v.35, n.3, p.171-177, 1995.
- FURLAN, S.A.; BOUILLOUD, P.; CASTRO, H.F. Influence of oxygen on ethanol and xylitol production by xylose fermenting yeasts. **Process Biochemistry**, London, v.29, p.657-662, 1994.
- GIRIO, F.M. et al. Effect of oxygen transfer rate on levels of key enzymes of xylose metabolism in *Debaryomyces hansenii*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.16, n.12, p.1074-1080, 1994.

GNANASAMBANDAN, R.; PROCTOR, A. Preparation of soy hull pectin. **Food Chemistry**, London, v.65, p.461-467, 1999.

GOSH, P.; SINGH, A. Physicochemical and biological treatments for enzymatic/microbial conversion of lignocellulosic biomass. **Advances in Applied Microbiology**, San Diego, v.39, p.259 – 333, 1993.

GRANSTRÖM, T.; OJAMO, H.; LEISOLA, M. Chemostat study of xylitol production by *Candida guilliermondii*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.55, p.36-42, 2001.

GURGEL, P.V. et al. Evaluation of sugarcane bagasse hydrolyzate treatments for xylitol production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, Sao Paulo, v.15, n.3, p.309-312, 1998.

HANDUMRONGKUL, C. et al. Cloning and expression of *Candida guilliermondii* xylose reductase gene (*xyl1*) in *Pichia pastoris*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.49, p.399-404, 1998.

HYVÖNEN, L.; KOIVISOINEN, P.; VOIROL, F. Food Technological evaluation of xylitol. **Advances in Food Research**, San Diego, v.28, p.373 – 403, 1982.

JEFFRIES, T.W. Utilization of xylose by bacteria, yeasts and fungi. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, Berlin, v. 27, p.1-32, 1983.

JEFFRIES, T.W. Engineering yeasts for xylose metabolism. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v.17, p.320-326, 2006.

JEFFRIES, T.W.; JIN, Y.S. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v.63, n.5, p.495-509, 2000.

JIN, Y.S.; LAPLAZA, J.M.; JEFFRIES, T.W. *Saccharomyces cerevisiae* engineered for xylose metabolism exhibits a respiratory response. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v.70, n.11, p.6816-6825, 2004.

KÖTTER, P. et al. Isolation and characterization of the *Pichia stipitis* xylitol dehydrogenase gene, *XYL2*, and construction of a xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* transformant. **Current Genetics**, New York, v.18, p.493-500, 1990.

KUHAD, R.C.; SINGH, A. Lignocellulose biotechnology: current and future prospects. **Critical Reviews in Biotechnology**, Boca Raton, v.13, n.2, p.151 – 172, 1993.

LEE, J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.56, p.1 – 24, 1997.

LYND, L.R.; WYMAN, C.E.; GERNGROSS, T.U. Biocommodity engineering. **Biotechnology Progress**, New York, v.15, n.5, p.777-793, 1999.

MAEKINEN, K.K. Xylitol and oral health. **Advances in Food Research**, San Diego, v.25, p.137-158, 1979.

MARTÍNEZ, A. et al. Detoxification of dilute acid hydrolysates of lignocellulose with lime. **Biotechnology Progress**, New York, v.17, p.287-293, 2001.

MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. Kinetic behavior of *Candida guilliermondii* yeast during production from highly concentrated hydrolysate. **Process Biochemistry**, London, v.39, p.1433-1439, 2004a.

MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolysates for use in fermentative processes: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v.93, p.1-10, 2004b.

NIGAM, P.; SINGH, D. Process for fermentative production of xylitol – a sugar substitute. **Process Biochemistry**, London, v.30, n.2, p.117 – 124, 1995.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. **Bioresource Technology**, Essex, v.74, p.17 – 24, 2000a.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibition and mechanism of inhibition. **Bioresource Technology**, Essex, v.74, p.25 – 33, 2000b.

PANAGIOTOU, G. et al. Fermentation performance and intracellular metabolite profiling of *Fusarium oxysporum* cultivated on glucose-xylose mixture. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.36, p.100-106, 2005.

PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J.M. Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. **Bioresource Technology**, Essex, v.65, p.191 – 201, 1998a.

PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J.M. Biotechnological production of xylitol. Part 2: Operation in culture media made with commercial sugars. **Bioresource Technology**, Essex, v.65, p.203 – 212, 1998b.

PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J.M. Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulosic hydrolysates. **Bioresource Technology**, Essex, v.66, p.25 – 40, 1998c.

PEPPER, T.; OLINGER, P.M. Xylitol in sugar-free confection. **Food Technology**, Chicago, v.10, p.98 – 106, 1988.

PREZIOSI-BELLOY, L.; NOLLEAU, V.; NAVARRO, J.M. Fermentation of hemicellulosic sugars and sugars mixtures to xylitol by *Candida parapsilosis*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v.21, p.124-129, 1997.

ROBERTO, I.C.; MANCILHA, I.M.; SATO, S. Influence of $k_L a$ on bioconversion of rice straw hemicellulose hydrolysate to xylitol. **Bioprocess Engineering**, New York, v.21, p.505-508, 1999.

ROBERTO, I.C. et al. Utilization of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Pichia stipitis*, for the production of ethanol. **Process Biochemistry**, London, v.26, p.15-21, 1991.

RUSSO, J.R. Xylitol. Anti-carie sweetener? **Engineering International**, Highlands Ranch, v.1, n.4, p.37 – 39, 1976.

SAHA, B.C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Amsterdam, v.30, p.279 – 291, 2003.

SAHA, B.C.; HAYASHI, K. **Lignocellulose biodegradation**. New Orleans: American Chemical Society, 2004. 315p.

SILVA, S.S. et al. Maximizing the xylitol production from sugar cane bagasse hydrolysate by controlling the aeration rate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, n.63-65, p.558-564, 1997.

SIVERS, M.V.; ZACCHI, G. A techno-economical comparison of three processes for the production of ethanol from pine. **Bioresource Technology**, Essex, v.51, p.43 – 52, 1995.

SNYDER, H.E.; KWON, T.W. **Soybean utilization**. New York: Van Nostrand Reinhold, 1987. 60 p.

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

TADA, K. et al. Microbial xylitol production from corn cobs using *Candida magnoliae*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v.98, n. 3, p.228-230, 2004.

TORGET, R. et al. Optimization of reverse-flow, 2-temperature, dilute-acid pre-treatment to enhance biomass conversion to ethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Clifton, v.58, p.85-101, 1996.

USDA - United States Department of Agriculture. **Foreign Agriculture Service - Production, Supply and Distribution Online. Oilseeds**. Washington, 2006. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline>> Acesso em: 24 nov.2006.

WALFRIDSSON, M. et al. Xylose-metabolizing *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressing the *TKL1* and *TAL1* genes encoding the pentose phosphate pathway enzymes transketolase and transaldolase. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.61, p.4184-4190, 1995.

WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S. Microbial conversion of D-xylose to xylitol. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v.86, n.1, p.1 – 14, 1998.

WINKELHAUSEN, E.; AMARTEY, S.A.; KUZMANOVA, S. Xylitol production from d-xylose at different oxygen transfer coefficients in a batch bioreactor. **Engineering in Life Sciences**, Weinheim, v.4, n.2, p.150-154, 2004.

YABLOCHKOVA, E.N. et al. The activity of key enzymes in xylose-assimilating yeasts at different rates of oxygen transfer to the fermentation medium. **Microbiology**, Moscow, v.73, n.2, p.129-133, 2004

YLIKAHRI, R. Metabolic and nutritional aspects of xylitol. **Advances in Food Research**, San Diego, v.25, p.159-180, 1979.

APÊNDICE

Apêndice A - Efeito dos tratamentos de detoxificação na composição dos compostos tóxicos do hidrolisado de casca de soja

Tratamentos*	Compostos tóxicos (g.L ⁻¹)		
	Fenol	Furfural	Ácido Acético
Original	0,79	0,28	1,04
Original, concentração	3,05	1,12	1,74
Concentração, pH 5.5	2,17	0,08	1,89
Concentração, CA 1 % (p/v)	1,85	0,12	1,53
Concentração, CA 2 % ((p/v)	1,75	0,08	1,47
Concentração, CA 5 % ((p/v)	1,27	0,07	1,32
Concentração, CA 10 % (p/v)	0,74	0,06	1,10

* O tratamento de detoxificação de concentração por evaporação a vácuo foi realizado a 70 °C, concentrando-se o hidrolisado original quatro vezes (SHH-4C). CA significa carvão ativado adicionado em diferentes concentrações ao SHH-4C: 1; 2; 5 e 10 % (p/v).