



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

**OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE DA CASCA DE SOJA (*Glycine max*) E AVALIAÇÃO  
DA CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE XILITOL E ETANOL POR  
MICROORGANISMOS SOBRE ESTE HIDROLISADO**

Ana Ribeiro Cassales

Porto Alegre

2010



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

**OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE DA CASCA DE SOJA (*Glycine max*) E  
AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE XILITOL E ETANOL POR  
MICROORGANISMOS SOBRE ESTE HIDROLISADO**

Ana Ribeiro Cassales

Química Industrial - UFSM

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 (a): Rosane Rech

Porto Alegre

2010

Cassales, Ana Ribeiro  
C343o Otimização da hidrólise da casca de soja (*Glycine max*) e avaliação da capacidade de produção de xilitol e etanol por microorganismos sobre este hidrolisado / Ana Ribeiro Cassales — Porto Alegre, 2010.

123 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2010.

Orientador: Marco Antônio Záchia Ayub.

Co-orientadora: Rosane Rech.

Bibliografia.

1.Hidrólise. 2. Casca de soja. 3. Xilitol. 4.Etanol. I. Título. II. Ayub, Marco Antônio Záchia (orient.). III. Rech, Rosane (co-orient).

CDU 664.162.036

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFRGS.

## AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, Capes, Pró-reitoria de Pós Graduação e Pró-reitoria de Pesquisa pelo auxílio financeiro.

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de realização do mestrado.

A Escola de Engenharia de Lorena/USP pela disponibilização de infra-estrutura para realização de parte do trabalho e a todas as pessoas que lá trabalham e que me ajudaram na realização do mesmo.

Ao professor e orientador Marco Antônio Záchia Ayub pelos ensinamentos passados e pelo apoio e compreensão nos momentos mais angustiantes.

A professora e co-orientadora Rosane Rech por ter disponibilizado equipamentos do seu laboratório indispensáveis à realização desse trabalho e pela ajuda em toda parte estatística.

Ao Professor Plinho Francisco Hertz não só pelos conhecimentos transmitidos, mas também por sua disponibilidade e gentileza sempre que era preciso. Por todas as conversas fossem elas referentes ao trabalho ou não.

À professora Maria do Carmo Ruaro Peralba, pela disponibilização dos cromatógrafos e auxílio indispensável nas análises cromatográficas.

A Priscila Souza-Cruz (Pri), por ter sido não só orientadora, mas também amiga e porque não dizer mãe em muitos momentos. Obrigada por ter me acompanhado do início ao fim do mestrado e me ajudado nas horas mais difíceis. Sem ela esse trabalho não seria o mesmo.

Aos colegas do laboratório pela amizade e companhia. Em especial, a Débora Faccin pela disponibilidade e colaboração na elaboração da parte estatística do trabalho, a Nicole Sehnem, Fernanda Pereira, Lílian Hickert, Janira Prichula e Ângela Machado por todas as horas de descontração durante os inúmeros cafés no Chick`s.

A minha querida bolsista de iniciação Ludmile Londero que me ajudou muito na reta final da realização deste trabalho. Obrigada por todas as idas ao ICTA nos horários mais inusitados.

As colegas do mestrado Vanessa Hermes (Van), Manuela Poletto (Manu) e Simone Pieniz (Si) pela amizade, compreensão e parceria. Foi muito bom ter convivido com vocês. Também agradeço as outras meninas do “210” (Fabi, Carla e Cris) que fizeram parte dessa trajetória.

A pessoas muito especiais que fazem parte de toda minha vida, minhas primas Clarissa e Anna Lúcia, minha tia Nara, minhas amigas de “Livramento” (Thaysa, Lelê, Helena, Natalie, Iza, Dari, Liana), as quais sempre me compreenderam e apoiaram nessa fase.

Ao meu namorado Marco Antônio, pelo amor, carinho, paciência e companheirismo. Por ter compartilhado comigo meus anseios e angústias e pelas incansáveis noites de trabalho no ICTA.

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 vocês pela confiança, pelo afeto, pelo apoio e incentivo, acreditando nesse trabalho, muitas vezes, mais do que eu mesma. Muito obrigada.

## RESUMO

### OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE DA CASCA DE SOJA E AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE PRODUÇÃO DE XILITOL E ETANOL POR MICRORGANISMOS SOBRE ESTE HIDROLISADO

Resíduos lignocelulósicos agroindustriais, como a casca de soja, são fontes abundantes e de baixo custo para produção biotecnológica de compostos de alto valor agregado. É o caso da produção de xilitol e etanol. Esse processo biotecnológico promove um aproveitamento completo dos resíduos lignocelulósicos, utilizando as frações celulósica e hemicelulósica para a obtenção de *commodities*. O presente trabalho teve como objetivo otimizar a hidrólise ácida diluída utilizando como ferramenta o planejamento experimental e ampliar os conhecimentos sobre a produção biotecnológica de xilitol e etanol mediante o cultivo de microrganismos sobre o hidrolisado de casca de soja. A casca da soja mostrou-se um resíduo bastante promissor, já que o teor de lignina total encontrado nestas amostras foi menor que 10% e o teor de açúcares fermentescíveis foi de 65%. O primeiro planejamento experimental realizado baseou-se em um planejamento fatorial completo  $2^3$  com ponto central. O tratamento, cujas variáveis foram 122 °C, 8,8 g g<sup>-1</sup> e 2 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> SS, foi o que obteve melhores resultados no maior tempo de reação (40 min), liberando em torno de 6,3 g L<sup>-1</sup> de xilose, 0,02 g L<sup>-1</sup> de furfural, 0,07 g L<sup>-1</sup> de hidroximetilfurfural e 1,5 g L<sup>-1</sup> de glicose. A relação sólido-líquido (na faixa de 8,8 a 11,2 g g<sup>-1</sup>) não foi significativa para liberação de glicose e xilose, e um aumento no tempo de reação mostrou como tendência o aumento da liberação dos açúcares. Com base nos resultados deste primeiro planejamento, um segundo planejamento experimental foi realizado abrangendo apenas as variáveis significativas para liberação de açúcares (temperatura e concentração de ácido). O segundo planejamento experimental baseou-se em um planejamento composto central  $2^2$ . A máxima solubilização dos açúcares (87% de eficiência) foi obtida em 153 °C e 1,8 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup>, gerando cerca de 10 g L<sup>-1</sup> total de tóxicos. Uma função objetivo foi elaborada a fim de limitar a formação de substâncias tóxicas (máximo de 4 g l<sup>-1</sup>) e maximizar a concentração dos açúcares. O melhor tratamento (59% de eficiência) foi de 118 °C e 2,8 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> SS em 40 minutos. Após a otimização do tratamento de hidrólise foram realizados cultivos com o hidrolisado obtido no melhor tratamento do primeiro planejamento experimental, concentrado 4 vezes. Com relação à produção de etanol e xilitol, foram avaliados cultivos com consórcios e isolados microbianos. O consórcio contendo *Zymomonas mobilis*, *Candida tropicalis* e *Candida guilliermondii*, em condições anaeróbias, produziu 3,1 g L<sup>-1</sup> e 2,2 g L<sup>-1</sup> de etanol em 132 horas de cultivo sobre hidrolisado de casca de soja e meio sintético, respectivamente. Este consórcio, em condições microaerófilas, produziu 6,7 g L<sup>-1</sup> de etanol (às 12 horas) e 2,3 g L<sup>-1</sup> de xilitol (84 horas de cultivo) sobre o hidrolisado de casca de soja, e consumiu 100% dos açúcares presentes no cultivo sobre meio sintético sem a produção de etanol e xilitol. As leveduras *C. guilliermondii* e *Debaryomyces hansenii*, reconhecidas produtoras de xilitol foram testadas isoladamente sobre hidrolisado de casca de soja, em condições microaerófilas. *C. guilliermondii* produziu 1,4 g L<sup>-1</sup> de etanol em 60 horas de cultivo e 3,6 g L<sup>-1</sup> de xilitol em 120 horas de cultivo sobre hidrolisado de casca de soja. Em meio sintético houve a produção de aproximadamente 7 g L<sup>-1</sup> de xilitol nas mesmas 120 horas. Não houve produção de etanol. *D. hansenii* produziu 8 g L<sup>-1</sup> de xilitol em 24 horas de cultivo sobre hidrolisado de casca de soja. Em meio sintético não foi observada a produção de etanol e xilitol.

## ABSTRACT

### OPTIMIZATION OF HYDROLYSIS OF SOY HULL AND AVALIATION OF PRODUCTION CAPACITY OF ETHANOL AND XYLITOL BY MICROORGANISMS ON THIS HYDROLYSED

Lignocellulosic agro-industrial residues such as soybean hulls, are abundant supplies and low cost for the biotechnological production of compounds of high added value. This applies to the production of xylitol and ethanol. This biotechnological process promotes complete recovery of lignocellulosic residues, using the cellulose and hemicellulose fractions, to obtain commodities. This study aimed to optimize the diluted acid hydrolysis using an experimental design and increase knowledge about the biotechnological production of xylitol and ethanol through the cultivation of microorganisms on the hydrolyzate of soybean hulls. Soybean hull showed a residue very promising, since the total lignin content found in these samples was less than 10% and the content of fermentable sugars was 65%. The first experimental design was carried out in a full factorial design  $2^3$ . The treatment (122 °C, 8.8 g g<sup>-1</sup> and 2 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DM), which was out-performed the larger reaction time (40 min), released about 1.5 g L<sup>-1</sup>, 6.3 g L<sup>-1</sup>, 0.02 g L<sup>-1</sup> and 0.07 g L<sup>-1</sup> of glucose, xylose, furfural and hydroxymethylfurfural, respectively. The solid-liquid ratio (range of 8.8 to 11.2 g g<sup>-1</sup>) was not significant for the release of glucose and xylose, and an increase in reaction time showed a trend increase in the release of sugars. Based on the results of this first design, a second experimental design was carried out covering only the significant variables for the release of sugars (temperature and concentration of acid). The second experimental design was based on a central composite design  $2^2$ . The maximum solubilization of sugars (87% efficiency) was obtained at 153 °C and 1.8 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DM, generating about 10 g L<sup>-1</sup> of total toxic. An objective function was developed to minimize the formation of toxic substances and maximize the concentration of sugars, which was limited to 4 g L<sup>-1</sup> the sum of toxic. The best treatment (59% efficiency) was 118 °C and 2.8 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DM in 40 minutes. After hydrolysis optimization, assays with microorganisms were carried out in the best hydrolyzate of the first experimental design, concentrated 4 times. The production of ethanol and xylitol were evaluated with isolated microbial crops and co-cultures. The consortium containing *Zymomonas mobilis*, *Candida tropicalis* and *Candida guilliermondii*, under anaerobic conditions, produced 3.1 g L<sup>-1</sup> and 2.2 g L<sup>-1</sup> ethanol (132 hours of culture) on hydrolyzate of soybean hulls and synthetic medium, respectively. Co-culture, under microaerophilic conditions, produced 6.7 g L<sup>-1</sup> ethanol (12 hours) and 2.3 g L<sup>-1</sup> of xylitol (84 hours) on the hydrolysate, and consumed 100% of sugars present in cultivation on synthetic medium without the production of ethanol and xylitol. Yeast *C. guilliermondii* and *Debaryomyces hansenii*, recognized producing xylitol were tested separately on hydrolyzate of soybean hulls, under microaerophilic conditions. *C. guilliermondii* produced 1.4 g L<sup>-1</sup> of ethanol in 60 hours of culture and 3.6 g L<sup>-1</sup> of xylitol in 120 hours of culture on hydrolyzate of soybean hulls. Synthetic medium was the production of approximately 7 g L<sup>-1</sup> of xylitol on the same 120 hours. There was no production of ethanol. *D. hansenii* produced 8 g L<sup>-1</sup> of xylitol in 24 hours of cultivation on hydrolyzate of soybean hulls in synthetic medium ethanol and xylitol were not produce.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. BIOMASSA.....	4
2.1.1. Materiais lignocelulósicos.....	5
2.1.1.1. Pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos.....	8
2.2. BIORREFINARIA.....	11
2.2.1. Bioconversão de hidrolisados lignocelulósicos a Etanol.....	12
2.2.2. Bioconversão de hidrolisados lignocelulósicos a Xilitol.....	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1. CASCA DE SOJA.....	20
3.2. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA CASCA DE SOJA.....	20
3.3. CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE DA CASCA DA SOJA.....	21
3.4. OBTENÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE CASCA DE SOJA.....	24
3.5. CONCENTRAÇÃO.....	24
3.6. MICRORGANISMOS, MANUTENÇÃO E INÓCULO.....	24
3.7. MEIO E CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO.....	25
3.7.1. Ensaio em Frascos agitados.....	26
3.7.2. Ensaio em biorreatores de cultivo submerso utilizando consórcios de microrganismos e isolados.....	26
3.8. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	27
3.8.1. Determinação do teor de lignina.....	27
3.8.2. Determinação do teor de celulose e hemicelulose.....	28
3.8.3. Determinação dos parâmetros fermentativos e de hidrólise.....	28
3.8.4. Determinação do teor de cinzas.....	29
3.8.5. Determinação da concentração celular.....	29
3.8.6. Determinação da concentração de açúcares, xilitol, etanol e ácido acético.....	30
3.8.7. Determinação da concentração de furfural e hidroximetilfurfural.....	30
3.8.8. Determinação da concentração dos fenóis totais.....	30

3.8.9. Determinação de pH e Pressão Osmótica.....	31
3.8.10. Determinação de proteína.....	31
3.8.11. Determinação de minerais.....	33
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CASCA DE SOJA.....	34
4.2. CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE DA CASCA DA SOJA.....	38
4.2.1. Identificação dos fatores que influenciam a hidrólise da casca de soja.....	38
4.2.1.1. Cinéticas de reação.....	39
4.2.1.2. Análises Estatísticas.....	41
4.2.2. Otimização das condições de hidrólise da casca de soja.....	49
4.2.2.1. Cinéticas de reação.....	49
4.2.2.2. Análises Estatísticas.....	53
4.3. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE XILITOL E ETANOL POR MICRORGANISMOS.....	64
4.3.1. Ensaio em frascos agitados.....	64
4.3.1.1. Avaliação do crescimento celular dos consórcios.....	66
4.3.1.2. Avaliação do consumo dos açúcares e produção de etanol e xilitol.....	67
4.3.2. Ensaio em Biorreatores de cultivo submerso.....	72
4.3.2.1. Hidrolisado Hemicelulósico de casca de soja.....	72
4.3.2.2. Ensaio em biorreatores de cultivo submerso utilizando consórcios de microrganismos Hidrolisado Hemicelulósico de casca de soja.....	73
4.3.2.3. Ensaio em biorreatores de cultivo submerso utilizando <i>Candida guilliermondii</i> e <i>Debaryomyces hansenii</i> .....	79
5. CONCLUSÕES.....	87
6. PERSPECTIVAS.....	89
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
8. APÊNDICE 1.....	101

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Resumo dos processos utilizados para produzir biocombustíveis através de diferentes tipos de biomassas.....	5
<b>Figura 2</b> - Esquema de biorrefinaria lignocelulósica multi-produtos.....	12
<b>Figura 3</b> - Esquema simplificado do metabolismo de xilose e arabinose em leveduras e fungos em integração com a via glicolítica até a produção de etanol.....	13
<b>Figura 4</b> - Representação esquemática das primeiras etapas da metabolização da D-xilose em leveduras.....	18
<b>Figura 5</b> - Cinéticas de liberação de: (A) glicose; (B) xilose; (C) arabinose; (D) ácido acético; (E) furfural e (F) HMF, a partir de hidrólise ácida diluída de casca de soja durante 40 minutos.....	39
<b>Figura 6</b> - Superfície de resposta gerada pelo ANOVA sobre a concentração de glicose ( $\text{g L}^{-1}$ ) em função da temperatura e concentração de ácido, no hidrolisado de casca de soja obtido em 40 minutos de reação.....	42
<b>Figura 7</b> - Superfície de resposta gerada pelo ANOVA sobre a concentração de xilose ( $\text{g L}^{-1}$ ) em função da temperatura e concentração de ácido, no hidrolisado de casca de soja obtido em 40 minutos de reação.....	43
<b>Figura 8</b> - Superfície de resposta gerada pelo ANOVA sobre a concentração de arabinose ( $\text{g L}^{-1}$ ) em função da concentração de ácido e relação sólido:líquido, no hidrolisado de casca de soja obtido em 40 minutos de reação.....	44
<b>Figura 9</b> - Superfície de resposta gerada pelo ANOVA sobre a concentração de ácido acético ( $\text{g L}^{-1}$ ) em função da temperatura e concentração de ácido, no hidrolisado de casca de soja obtido em 40 minutos de reação.....	46
<b>Figura 10</b> - Superfície de resposta gerada pelo ANOVA sobre a concentração de furfural ( $\text{g L}^{-1}$ ) em função da temperatura e concentração de ácido, no hidrolisado de casca de soja obtido em 40 minutos de reação.....	47

<b>Figura 11</b> - Superfície de resposta gerada pelo ANOVA sobre a concentração de HMF ( $\text{g L}^{-1}$ ) em função da temperatura e concentração de ácido, no hidrolisado de casca de soja obtido em 40 minutos de reação.....	48
<b>Figura 12</b> - Cinéticas de liberação de: (A) glicose; (B) xilose; (C) arabinose; (D) ácido acético; (E) furfural, (F) HMF e (G) lignina solúvel, a partir de hidrólise ácida diluída de casca de soja durante 60 minutos.....	50
<b>Figura 13</b> - Superfície de resposta gerada pelo ANOVA sobre a concentração de glicose ( $\text{g L}^{-1}$ ) no hidrolisado de casca de soja obtido em 40 minutos de reação.....	54
<b>Figura 14</b> - Superfície de resposta gerada pelo ANOVA sobre a concentração de xilose ( $\text{g L}^{-1}$ ) no hidrolisado de casca de soja obtido em 40 minutos de reação.....	56
<b>Figura 15</b> - Superfície de resposta gerada pelo ANOVA sobre a concentração de arabinose ( $\text{g L}^{-1}$ ) no hidrolisado de casca de soja obtido em 40 minutos de reação.....	57
<b>Figura 16</b> - Superfície de resposta gerada pelo ANOVA sobre a concentração de ácido acético ( $\text{g L}^{-1}$ ) no hidrolisado de casca de soja obtido em 40 minutos de reação.....	58
<b>Figura 17</b> - Superfície de resposta gerada pelo ANOVA sobre a concentração de furfural ( $\text{g L}^{-1}$ ) no hidrolisado de casca de soja obtido em 40 minutos de reação.....	59
<b>Figura 18</b> - Superfície de resposta gerada pelo ANOVA sobre a concentração de HMF ( $\text{g L}^{-1}$ ) no hidrolisado de casca de soja obtido em 40 minutos de reação.....	60
<b>Figura 19</b> - Superfície de resposta gerada pelo ANOVA sobre a concentração de lignina solúvel ( $\text{g L}^{-1}$ ) no hidrolisado de casca de soja obtido em 40 minutos de reação.....	61
<b>Figura 20</b> - Superfície de resposta gerada pela função objetiva. Pontos representam tratamentos sob diferentes temperaturas e concentração de ácido.....	63
<b>Figura 21.</b> Concentração celular ( $\text{g L}^{-1}$ ): Consórcio 1(◆); Consórcio 2 (■) e Consórcio 3 (▲).....	66

<b>Figura 22</b> - Comparação do consumo de glicose, xilose e arabinose e produção de etanol e xilitol ( $\text{g L}^{-1}$ ) pelos consórcios 1(■); 2 (▲) e 3 (●) em meio semi-sintético.....	67
<b>Figura 23</b> - Cromatogramas de amostras obtidas do cultivo dos consórcios 1, 2 e 3 em meio de cultivo semi-sintético às 60 horas de cultivo.....	70
<b>Figura 24</b> - Crescimento celular do consórcio composto por <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida guilliermondii</i> e <i>Zymomonas mobilis</i> em hidrolisado de casca de soja (■) e meio semi-sintético (●) sob condições anaeróbias (linha cheia) e microaerófilas (linha vazada). Resultados são a média de dois experimentos.....	74
<b>Figura 25</b> - Cultivo do consórcio composto por <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida guilliermondii</i> e <i>Zymomonas mobilis</i> sobre hidrolisado de casca de soja (A) e meio semi-sintético (B) sob condições anaeróbias.....	75
<b>Figura 26</b> - Cultivo do consórcio composto por <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida guilliermondii</i> e <i>Zymomonas mobilis</i> em hidrolisado de casca de soja (A) e meio semi-sintético (B) sob condições microaerófilas.....	77
<b>Figura 27</b> - Crescimento celular de <i>C. guilliermondii</i> (●) e <i>D. hansenii</i> (■) sobre hidrolisado de casca de soja (linha vazada) e meio semi-sintético (linha cheia) sob condições microaerófilas.....	79
<b>Figura 28</b> - pH dos cultivos de <i>C. guilliermondii</i> (◆) e <i>D. hansenii</i> (■) sobre hidrolisado de casca de soja (linha vazada) e meio semi-sintético (linha cheia) sob condições microaerófilas.....	81
<b>Figura 29</b> - Cultivo de <i>Candida guilliermondii</i> sobre hidrolisado de casca de soja (A) e meio semi-sintético (B) sob condições microaerófilas.....	82
<b>Figura 30</b> - Cultivo de <i>Debaryomyces hansenii</i> sobre hidrolisado de casca de soja (A) e meio semi-sintético (B) sob condições microaerófilas.....	84

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial completo $2^3$ com três repetições no ponto central.....	22
<b>Tabela 2</b> - Esquema da matriz do planejamento fatorial $2^3$ com três repetições no ponto central.....	22
<b>Tabela 3</b> - Níveis dos fatores utilizados no planejamento central composto $2^2$ com três repetições no ponto central.....	23
<b>Tabela 4</b> - Esquema da matriz do planejamento central composto $2^2$ com três repetições no ponto central.....	23
<b>Tabela 5</b> - Composição química casca de soja.....	34
<b>Tabela 6</b> – Composição de minerais da casca da soja.....	35
<b>Tabela 7</b> - Comparação entre a composição química da casca de soja utilizada neste trabalho com outros resíduos lignocelulósicos agroindustriais e com outras composições da mesma, descritas na literatura.....	36
<b>Tabela 8</b> - Análise de variância para a concentração de glicose no hidrolisado obtido em 40 minutos de reação.....	42
<b>Tabela 9</b> - Análise de variância para a concentração de xilose no hidrolisado obtido em 40 minutos de reação.....	43
<b>Tabela 10</b> - Análise de variância para a concentração de arabinose no hidrolisado obtido em 40 minutos de reação.....	44
<b>Tabela 11</b> - Análise de variância para a concentração de ácido acético no hidrolisado obtido em 40 minutos de reação.....	45
<b>Tabela 12</b> - Análise de variância para a concentração de furfural no hidrolisado obtido em 40 minutos de reação.....	46

<b>Tabela 13</b> - Análise de variância para a concentração de HMF no hidrolisado obtido em 40 minutos de reação.....	47
<b>Tabela 14</b> - Análise de variância para a concentração de glicose no hidrolisado obtido em 40 minutos de reação.....	54
<b>Tabela 15</b> - Análise de variância para a concentração de xilose no hidrolisado obtido em 40 minutos de reação.....	55
<b>Tabela 16</b> - Análise de variância para a concentração de arabinose no hidrolisado obtido em 40 minutos de reação.....	56
<b>Tabela 17</b> - Análise de variância para a concentração de ácido acético no hidrolisado obtido em 40 minutos de reação.....	57
<b>Tabela 18</b> - Análise de variância para a concentração de furfural no hidrolisado obtido em 40 minutos de reação.....	58
<b>Tabela 19</b> - Análise de variância para a concentração de HMF no hidrolisado obtido em 40 minutos de reação.....	59
<b>Tabela 20</b> - Análise de variância para a concentração de lignina solúvel no hidrolisado obtido em 40 minutos de reação.....	60
<b>Tabela 21</b> - Equações para cada composto usado para elaboração da função objetiva.....	62
<b>Tabela 22</b> - Composição de cepas dos consórcios avaliados sobre meio semi-sintético em frascos agitados.....	65
<b>Tabela 23</b> - Resultados obtidos para produção de etanol e xilitol em frascos agitados.....	69
<b>Tabela 24</b> - Composição (g L <sup>-1</sup> ) do hidrolisado de casca de soja original e concentrado 4 vezes.....	72
<b>Tabela 25</b> - Resumo do consumo dos açúcares e da produção de etanol e xilitol pelos diferentes microrganismos testados sobre meio sintético e hidrolisado de casca de soja.....	86

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\eta$	Eficiência de conversão	<b>LAD</b>	L-arabinitol 4-desidrogenase
$\beta_F$	Coefficiente de furfural	<b>LXR</b>	L-xilulose redutase
$\beta_{HMF}$	Coefficiente de HMF	<b>MQ</b>	Média quadrática
$A_{LIG}$	Absorbância de todos os compostos	<b>MS</b>	Meio sintético
<b>AR</b>	L-arabinose (aldose) redutase	<b>MS-A</b>	Meio sintético em anaerobiose
<i>Ara</i>	Arabinose	<b>MS-MA</b>	Meio sintético em microaerofilia
$C_F$	Concentração de furfural	<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
$C_{HMF}$	Concentração de HMF	<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
<b>CLAE</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência	<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotídeo-P
$C_{LIG}$	Concentração de lignina solúvel	<b>Q<sub>P</sub></b>	Produtividade volumétrica
<b>DO</b>	Densidade óptica	<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>ESP</b>	Específico (g produto g <sup>-1</sup> glicose ou xilose)	<b>SL</b>	Lignina solúvel
<b>FC</b>	Fator de conversão da celulose	<b>SQ</b>	Soma quadrática
<i>F<sub>obj</sub></i>	Função objetiva	<b>SS</b>	Sólido seco
<b>FP</b>	Fator de perda por hidrólise para celulose	<b>TOT</b>	Total (g de produto g <sup>-1</sup> total açúcares)
<i>Fur</i>	Furfural	<i>tox</i>	Soma de furfural, HMF, ácido acético e lignina solúvel
<i>g</i>	Aceleração da gravidade	<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colônia
<b>GDL</b>	Graus de liberdade	<b>vvm</b>	Volume de ar/ volume de meio/minuto
<i>Glu</i>	Glicose	<i>w</i>	Peso
<b>H</b>	Hidrolisado	<b>XDH</b>	Xilitol desidrogenase
<b>H-A</b>	Hidrolisado em anaerobiose	<b>XI</b>	D-xilose isomerase
<i>HAc</i>	Ácido acético	<b>XK</b>	D-xiluloquinase
<b>H-MA</b>	Hidrolisado em microaerofilia	<b>XR</b>	D-xilose (aldose) redutase
<b>HMF</b>	Hidroximetilfurfural	<i>Xyl</i>	Xilose
<b>ICP-OES</b>	Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente	<b>YM</b>	meio extrato levedura e extrato de malte (Yeast Malt)

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, várias pesquisas têm sido desenvolvidas na área de produção de compostos de alto valor agregado utilizando como precursores hidrolisados de materiais lignocelulósicos. Esses materiais englobam basicamente resíduos agroindustriais como cascas, palhas e bagaços. O acúmulo desses materiais na natureza gera problemas de cunho ambiental, devido à decomposição descontrolada do mesmo, e também de cunho econômico, tendo em vista que apenas uma pequena parcela desses resíduos são subaproveitados no beneficiamento de rações animais e adubos ecológicos, ocorrendo a perda de potenciais recursos energéticos. A produção biotecnológica de “*commodities*” a partir de hidrolisados de resíduos agroindustriais hoje é uma alternativa promissora, não só para agregar valor aos resíduos, mas também como uma alternativa mais econômica e limpa de produção de xilitol e etanol.

Uma visão geral das publicações envolvendo resíduos agroindustriais 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; e do bagaço de cana-de-açúcar no Brasil. Porém, no Brasil, além da cultura de cana-de-açúcar que se concentra na região sudeste do país, temos a cultura do grão de soja, do qual o Brasil é o segundo maior produtor e exportador mundial, ficando atrás apenas dos Estados Unidos. Sendo que, as projeções são de que a produção e a exportação da soja sejam lideradas apenas pelo Brasil a partir das próximas safras. O Rio Grande do Sul é o terceiro estado produtor de soja, gerando 20% da produção total do país. No ano de 2008, aproximadamente 211 milhões de toneladas de soja foram produzidos no mundo, o que gerou um acúmulo de cerca de 17 milhões de cascas de soja, um dos principais resíduos do

beneficiamento dessa cultura e um problema na esfera ambiental para a indústria processadora de soja.

Para que os resíduos lignocelulósicos sejam bioconvertidos, é necessária a utilização de pré-tratamentos, que liberem os açúcares fermentescíveis existentes na composição dos materiais lignocelulósicos. Esses pré-tratamentos podem ser realizados mediante hidrólise química ou enzimática. Uma técnica fundamentada e bastante difundida é a hidrólise ácida diluída. Através dela ocorre a liberação das pentoses (xilose e arabinose) e hexoses (manose, galactose e outros) constituintes da hemicelulose. Sendo o hidrolisado hemicelulósico rico principalmente em pentoses, como a xilose.

Um conceito que se busca atualmente, quando falamos em processos fermentativos de materiais lignocelulósicos é de biorrefinaria, o qual visa aproveitar as sinergias entre a produção de biocombustíveis e outros bioprodutos de alto valor agregado, aumentando a diversidade econômica da biorrefinaria. Tanto etanol quanto xilitol, um composto amplamente usado na indústria alimentícia e farmacêutica, podem ser formados no processo fermentativo dos materiais lignocelulósicos. A fermentação de hidrolisados hemicelulósicos a etanol e/ou xilitol requer a presença de microrganismos que fermentem tanto as hexoses quanto às pentoses do meio, inserindo-se no contexto de biorrefinaria. Para isso, sistemas de co-fermentações são interessantes, utilizando tanto microrganismos que convertam simultaneamente glicose e xilose a etanol e xilitol, respectivamente, bem como glicose e xilose a etanol. As condições de fermentação empregadas são as que irão determinar os produtos finais do processo.

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.

O presente trabalho teve por objetivo ampliar os conhecimentos sobre a produção biotecnológica de xilitol e etanol mediante o cultivo de microrganismos sobre o hidrolisado de casca de soja. Para tanto, em um primeiro momento, foi elaborado o hidrolisado de casca de soja utilizando-se a hidrólise ácida diluída e a posterior concentração do mesmo. A fermentabilidade e possibilidade de produção de xilitol e etanol foram verificadas a partir de experimentos cultivando-se consórcios de microrganismos em meio sintético e em hidrolisado de casca de soja, foram eles: *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida guilliermondii*, *Candida tropicalis*, *Candida utilis*, *Candida kefir*, *Candida silvicola* e *Zymomonas mobilis*. Além disso, experimentos cultivando-se separadamente *Candida guilliermondii* e *Debaryomyces hansenii* sobre o hidrolisado de casca de soja foram realizados para verificação da conversão dos açúcares presentes em xilitol.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

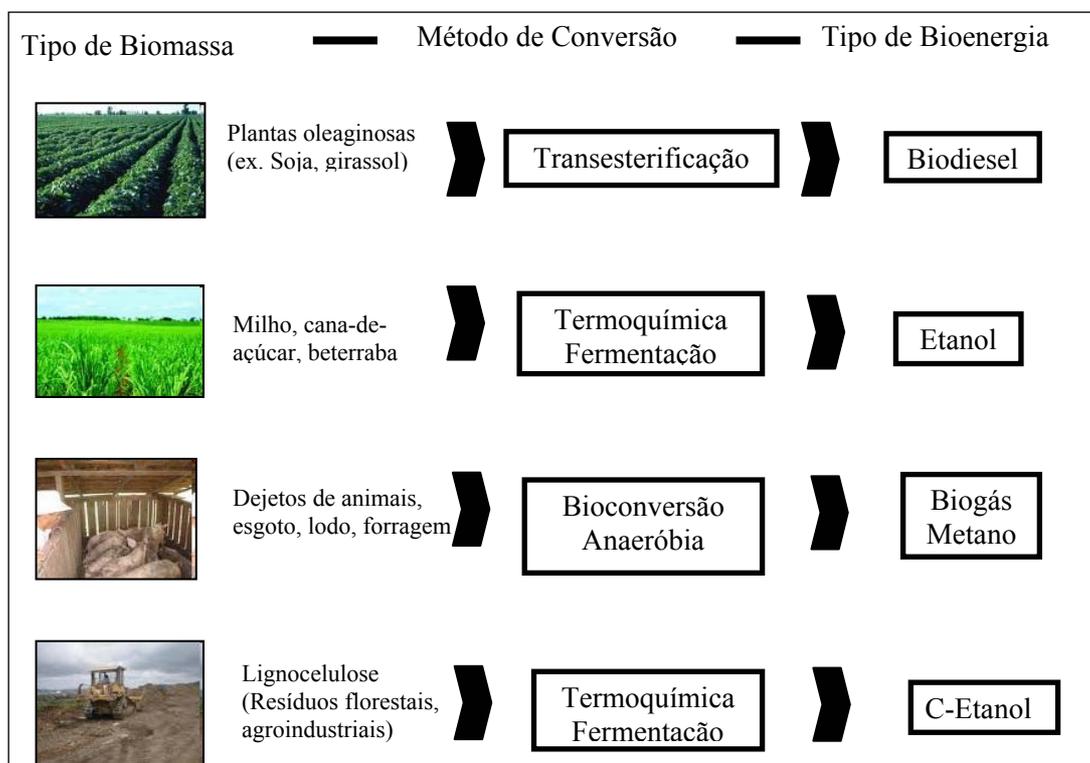
### 2.1. BIOMASSA

Atualmente, o petróleo juntamente com o gás natural e o carvão mineral somam cerca de 80% das fontes de energia no mundo (MAPA/CONAB, 2009), porém essas fontes fósseis além de serem limitadas, influenciam consideravelmente nas condições do meio ambiente, promovendo a poluição do mesmo e mudanças climáticas (GÓES E MARRA, 2008). Nesse contexto, diversas pesquisas têm se empenhado em desenvolver tecnologias alternativas de geração de energia que reduzam a dependência das fontes fósseis e que sejam domesticamente disponíveis, renováveis e menos poluentes (CANACKI E SANLI, 2008).

A biomassa é uma candidata bastante atrativa para desempenhar esse papel, uma vez que é considerada a única fonte orgânica derivada de animais ou plantas, sustentável para produção de combustíveis líquidos. Essa é uma fonte renovável, abundante e de baixo custo, que direta ou indiretamente é produzida pela fotossíntese, fixando o carbono da atmosfera em carbono residente, através da formação dos carboidratos presentes na composição da biomassa -  $6 \text{ CO}_2 + 6 \text{ H}_2\text{O} \Rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{ O}_2$  (ZHANG, 2008) (Figura 1).

Nos últimos anos, o tipo de biomassa mais estudado é a biomassa vegetal, sendo que, para que ocorra a substituição das moléculas fósseis utilizadas hoje seria necessária a conversão de toda a planta em fonte de energia, especialmente as partes não utilizadas para alimentação (OCTAVE E THOMAS, 2009). A biomassa vegetal é composta por duas classes, a primeira é formada por açúcares de reserva como o amido e a sacarose que é amplamente utilizada pelas indústrias alimentícias e de bioconversão a etanol. A segunda

classe é composta pelas partes estruturais da planta, é o caso da lignocelulose, que é formada por açúcares mais complexos e de difícil acesso (OCTAVE E THOMAS, 2009).



**Figura 1** - Resumo dos processos utilizados para produzir biocombustíveis através de diferentes tipos de biomassas (Adaptado de EKSIOGLU et al., 2009).

### 2.1.1. Materiais lignocelulósicos

Materiais lignocelulósicos compreendem resíduos provenientes de agroindústrias, florestas, tratamento de resíduos sólidos municipais, gramas perenes, entre outros (ADEN et al., 2002). Segundo Kumar e Singh (2008) os maiores componentes da parede celular de plantas são a celulose, a hemicelulose e a lignina, além de vários extrativos e compostos inorgânicos. A proporção destes componentes varia na composição dependendo da espécie da planta, idade, tempo de colheita e condição ou estágio de crescimento (JEFFRIES E JIN, 2000). A celulose é um homopolímero extremamente ordenado de celobiose, o qual é dímero de glicose, que possui em sua extensão cerca de 10.000 unidades glicosídicas formando uma cadeia rígida em forma de fibras. A hemicelulose por sua vez é um heteropolímero menor,

com grau de polimerização entre 100 e 200 e possui muitas ramificações contendo diferentes carboidratos como a xilose, arabinose, manose, galactose, glicose, assim como ácidos urônicos. Dependendo da predominância do tipo de açúcar as hemiceluloses podem ser chamadas de arabino-xilanas, mananas, glicanas ou galactanas. Esses açúcares contêm cinco (pentoses) ou seis (hexoses) carbonos em sua estrutura e são unidos por ligações glicosídicas do tipo 1-3, 1-4 e 1-6, quase sempre acetiladas formam uma estrutura fraca e hidrofílica que serve como uma conexão entre a lignina e as fibras de celulose, além de conferir rigidez ao complexo celulose-hemicelulose-lignina (STAMBUK et al., 2008). A lignina por sua vez é uma macromolécula tridimensional composta basicamente por unidades de fenilpropano, que se processa por via radicalar a partir da reação de três diferentes álcoois cinâmicos precursores (guaiacil, siringil e *p*-hidroxifenil). Na parede celular, a lignina está associada às polioses através de interações físicas e ligações covalentes. O fato de a lignina envolver as células funcionando como uma “cola” dificulta a biodegradação, protege a planta contra o ataque de microrganismos e confere coesão à estrutura interna além de resistência ao esforço mecânico (FENGEL E WEGENER, 1989; HOFRICHTER, 2002; READING, et al., 2003).

Os extrativos consistem de ceras, gorduras, resinas, taninos, óleos essenciais, compostos fenólicos, terpenos, ácidos alifáticos, álcoois e substâncias inorgânicas (KUHAD & SINGH, 1993). A lignocelulose foi sendo selecionada durante a evolução para ser o elemento chave da estrutura da planta e conseqüentemente ser resistente aos estresses bióticos e abióticos. Essa característica acaba sendo um “gargalo” na indústria processadora dessa biomassa (OCTAVE E THOMAS, 2009).

Em estimativa feita por Kim e Yum (2006) são gerados 1,5 trilhão de toneladas de biomassa lignocelulósica por ano, tornando essa uma fonte inesgotável de matéria-prima para formação de bioprodutos, como o etanol e o xilitol. Esse enorme acúmulo de resíduos lignocelulósicos provém em grande parte do processamento de culturas agrícolas. Nesse

âmbito, merecem destaque as significativas quantidades de resíduos de plantas remanescentes e inutilizadas após as colheitas de sementes e grãos, bem como os resíduos oriundos do manufaturamento em indústrias.

No Brasil, a área ocupada, atualmente, com a cultura de cana-de-açúcar, por exemplo, é de aproximadamente 9 milhões de hectares, superior em 11,5 % à safra anterior (MAPA/CONAB, 2009). A cada ano são produzidas toneladas de resíduos oriundos dessa cultura, o chamado bagaço de cana, o qual é massivamente estudado para bioconversão a etanol por grupos de pesquisa do sudeste brasileiro. Estados como o Rio Grande do Sul, que não participam do mercado alcooleiro, não produzem bagaço de cana com grande expressão, em compensação este estado é considerado um dos maiores produtores de soja do Brasil e conseqüentemente de resíduos provenientes do processamento desse grão. O Brasil é o segundo maior produtor e exportador de soja no mundo, ficando atrás apenas dos EUA, sendo que as projeções segundo a USDA - United States Department of Agriculture, (2008) são de que o Brasil assumirá a primeira posição a partir das próximas safras. Na safra 2008/2009 a produção do Brasil atingiu 57,63 milhões de toneladas em 21,56 milhões de hectares de área plantada (MAPA/CONAB, 2009). Já o Rio Grande do Sul é o terceiro maior produtor de soja no Brasil, perfazendo 20% da produção de soja no país, ficando atrás do estado de Mato Grosso e Goiás (MAPA/CONAB, 2009).

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 E PROCTOR, 1999). Considerando a produção mundial de soja em 2008 de 210,6 milhões de toneladas (EMBRAPA, 2009), foram geradas em todo o mundo, aproximadamente, 17 milhões de toneladas de casca de soja, o que torna esse resíduo lignocelulósico um dos mais expressivos em volume e uma alternativa interessante para bioconversão do seu hidrolisado a produtos de alto valor agregado.

### *2.1.1.1. Pré-tratamentos de materiais lignocelulósicos*

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). A celulose possui regiões cristalinas e amorfas, sendo que a forma cristalina é mais resistente à degradação química, microbiana e enzimática. Os graus de polimerização da celulose é que irão determinar a severidade do pré-tratamento a ser utilizado quando temos por objetivo liberar a glicose do composto (COHEN et al., 2005). Dessa forma a cristalização natural da lignocelulose e a sua resistência à hidrólise são os maiores obstáculos na produção de açúcares fermentescíveis de forma economicamente viável (KUMAR et al., 2008). Os pré-tratamentos se fazem necessários, pois provocam efeitos como o aumento na acessibilidade na área de superfície, redução na cristalização da celulose, despolimerização parcial da celulose, solubilização da hemicelulose e/ou lignina e a modificação da estrutura da lignina (MARGEOT et al., 2009). Muitas tecnologias têm sido propostas, geralmente combinando processos físicos e químicos. Para tratamentos físicos existem diversos tipos de moagem, já os tratamentos químicos e físicos incluem explosão a vapor, extração por água líquida quente (LHW), explosão de fibra com amônia (AFEX), hidrólise alcalina, extração por solventes, hidrólise ácida diluída, entre outros (SUN E CHENG, 2002). Além desses processos, ainda existe o tratamento de deslignificação biológica e a própria hidrólise enzimática da celulose, que necessita de maior tempo de processo e possui alto custo de produção, respectivamente (SUN E CHENG, 2002). Essas tecnologias visam à minimização da degradação de açúcares como glicose e xilose e formação de inibidores (compostos fenólicos e furânicos), assim como a limitação de consumo de produtos químicos, energia, água e a produção de resíduos (MARGEOT et al., 2009). 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 que, juntamente com a explosão a vapor, é utilizada hoje em escala piloto (projeto *New Improvements for Ligno-cellulosic Ethanol* – NILE, Agência Eurec).

O pré-tratamento com ácidos diluídos envolve o uso de ácido sulfúrico, nítrico ou clorídrico e tem sido citado como o melhor tipo de pré-tratamento para resíduos agroindustriais (SILVERSTEIN et al., 2007). Existem, basicamente, dois tipos de tratamento ácido diluído: elevadas temperaturas (superiores a 160 °C) em 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) em processo por batelada e alto teor de sólidos (10 – 40 %). A hidrólise ácida diluída em condições menos severas pode atingir altas taxas de conversão de xilana em xilose, já quando altas temperaturas são empregadas, a hidrólise da celulose é favorecida (MCMILLAN, 1994). O emprego de hidrólise ácida diluída apresenta várias vantagens quando comparada à utilização dos ácidos concentrados (SUN E 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 E ZACCHI, 1995).

Um fator importante a ser considerado é que durante a hidrólise ácida diluída, dependendo das condições empregadas, compostos secundários dos açúcares e da lignina podem ser gerados, inibindo o crescimento de microrganismos fermentadores que serão utilizados posteriormente a esta etapa (MUSSATO E ROBERTO, 2004). Segundo PALMQVIST E HAHN-HÄGERDAL (2000) quando altas temperaturas e pressões são utilizadas no pré-tratamento, xilose e glicose podem ser degradadas em furfural e hidroximetilfurfural, respectivamente, os quais podem ser posteriormente degradados em ácido fórmico e ácido fórmico e levulínico, respectivamente. Além desses compostos outras substâncias tóxicas aos microrganismos podem ser formadas durante a hidrólise como

compostos fenólicos que são gerados a partir da quebra parcial da lignina, ácidos siríngico, vanílico, palmítico, entre outros.

As concentrações desses inibidores no meio de fermentação merecem atenção, pois podem prejudicar o bioprocessamento. Delgenes et al. (1996) mostraram que concentrações de furfural de 0,5, 1,0 e 2,0 g L<sup>-1</sup> reduziram o crescimento de *Pichia stipitis* em 25%, 47% e 99%, respectivamente. Este mesmo estudo com concentrações de hidroximetilfurfural de 0,5, 0,75, e 1,5 g L<sup>-1</sup> mostrou uma redução de 43%, 70% e 100% no crescimento de *P. stipitis*, respectivamente. Além desses dois compostos, ainda existem outros compostos, como o ácido acético que configura como tóxico ao microrganismo em concentrações superiores a 3 g L<sup>-1</sup>, enquanto os produtos de degradação da lignina (compostos fenólicos) são tóxicos aos microrganismos mesmo quando em baixas concentrações (FELIPE et al., 1995; PARAJÓ et al., 1998b; ROBERTO et al., 1991). Dependendo das concentrações de tóxicos, o hidrolisado pode necessitar de algum tipo de tratamento de destoxificação, como por exemplo, o emprego de resinas de troca iônica, carvão ativado, enzimas ligninolíticas, pré-fermentação com fungos filamentosos, tratamentos com álcalis ou sulfitos, entre outros (MUSSATO E ROBERTO, 2004).

Além dos tratamentos de destoxificação 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 considerada um método físico de destoxificação, pois, dependendo das condições aplicadas (temperatura e pressão) ocorre a redução de compostos voláteis, tais como, ácido acético e furfural (MUSSATO E ROBERTO, 2004).

A precipitação de compostos tóxicos mediante ajuste de pH para os valores ideais de cultivo consiste em método químico de destoxificação (MARTINEZ et al., 2001).

## 2.2. BIORREFINARIA

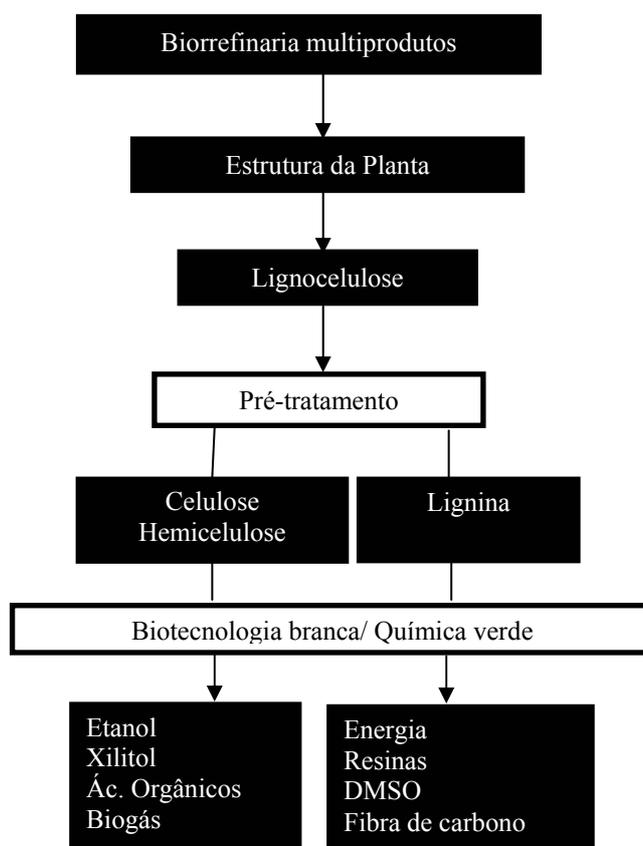
O conceito de biorrefinaria é baseado no uso de moléculas de carbono extraídas de plantas com o objetivo de substituir o carbono oriundo do petróleo e do gás natural (KAMM E KAMM, 2004). A biorrefinaria pode ser dita de primeira geração, quando utiliza açúcares considerados reservas metabólicas da planta, é o caso da sacarose e do amido, que são açúcares facilmente acessíveis e que já tem tecnologias firmadas para produção de bioetanol tanto no Brasil quanto nos Estados Unidos. Ou ainda, a biorrefinaria pode ser dita de segunda geração, a qual se baseia na produção de bioetanol, entre outros produtos, através da utilização do complexo lignocelulósico (celulose, hemicelulose e lignina). As vantagens na utilização de materiais lignocelulósicos como matéria-prima são a abundância na natureza e o fato de não haver concorrência com produção de alimentos (OCTAVE E THOMAS, 2009).

Segundo ZHANG (2008), as refinarias de petróleo com o objetivo de atingir taxas máximas de eficiência econômica, acabam sempre produzindo múltiplos produtos (diesel, gasolina, óleo lubrificante, etc.). Isso porque uma planta que produz apenas um produto será um grande risco para os investidores e obterá um fraco desempenho perante as flutuações do mercado econômico. Dessa forma, é preciso aproveitar as sinergias entre a produção de biocombustíveis e bioprodutos de alto valor agregado, pois mais tarde isso irá aumentar a diversidade econômica da biorrefinaria de biomassa (WYMAN, 2003).

A Figura 2 mostra produtos para diferentes cenários de uma biorrefinaria de materiais lignocelulósicos: (a) simples utilização (todo açúcar convertido em etanol e lignina como combustível de queima), (b) utilização parcial (todo açúcar convertido em etanol, metade da lignina como combustível de queima e a outra metade transformados em materiais poliméricos e ácido acético como *commodities*), (c) utilização completa (glicose convertida em etanol, xilose e outros açúcares menores em produtos de alto valor agregado, toda lignina

usada na produção de materiais poliméricos e ácido acético como *commoditie*), respectivamente (ZHANG, 2008).

Biorrefinarias multiprodutos tem mais possibilidade de se firmarem economicamente, tanto as de utilização parcial (\$288/tonelada) ou completa (\$641/tonelada), isso se as tecnologias de fracionamento da lignocelulose forem bem desenvolvidas (ZHANG, 2008).



**Figura 2** - Esquema de biorrefinaria lignocelulósica multi-produtos (Adaptado de OCTAVE E THOMAS, 2009).

### 2.2.1. Bioconversão de hidrolisados lignocelulósicos a Etanol

A fermentação de hidrolisados lignocelulósicos a etanol requer a presença de microrganismos que fermentem tanto as hexoses (glicose, manose e galactose), quanto as pentoses (xilose e arabinose) na presença de compostos inibitórios, incluindo ácidos fracos,

furaldeídos e fenóis (MARGEOT et al., 2009). Muitas leveduras são conhecidas por fermentar xilose, incluindo gêneros como *Candida*, *Pichia*, *Hansenula*, *Debaryomyces*, *Schawannyomyces*, entre outras. Se a xilose for convertida a xilulose (Figura 3), um isômero da mesma, muitas leveduras serão capazes de fermentar a xilose diretamente a etanol (JEFFRIES E SHI, 1999).

**Figura 3** - Esquema simplificado do metabolismo de xilose e arabinose em leveduras e fungos em integração com a via glicolítica até a produção de etanol (Adaptado de STAMBUCK et al., 2008). Abreviações: AR, L-arabinose (aldose) redutase; LAD, L-arabinitol 4-desidrogenase; LXR, L-xilulose redutase; XR, D-xilose (aldose) redutase; XDH, xilitol desidrogenase; XI, D-xilose isomerase; XK, D-xiluloquinase.

As concentrações de etanol são geralmente maiores quando o substrato é a D-xilulose e o acúmulo de xilitol é geralmente menor do que quando o substrato é a própria xilose (SAHA E WOODWARD, 1997). Gong et al. (1983) testou 20 espécies de *Candida* quanto à habilidade de fermentar D-xilose. Todas as espécies cresceram bem no meio. Etanol foi o maior produto formado entre a maioria das espécies testadas e arabitól o segundo produto com maior formação, sendo que, cerca de 10-50% de xilitol foi produzido pelas mesmas. Porém as espécies de leveduras reconhecidas como melhores fermentadoras de xilose a etanol são *Pichia stipitis*, *P. tannophilus* e *Candida shehatae*. Dentre as leveduras que fermentam xilose, *P. stipitis* configura como a mais promissora para aplicação industrial, uma vez que é capaz de converter xilose e quase todos os açúcares presentes em hidrolisados lignocelulósicos a etanol, com fatores de conversão de 0,3 – 0,44 g g<sup>-1</sup> de substrato (STAMBUCK et al., 2008).

Um dos fatores que afeta significativamente a taxa de utilização dos carboidratos disponíveis e sua eventual conversão a etanol é aeração do cultivo (SAHA E WOODWARD, 1997). A limitação de oxigênio pode estar associada ao acúmulo de etanol no meio. Sob

condições aeróbias, grande parte da xilose metabolizada é convertida a xilitol, que é 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 co-fatores 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 a 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). Além disso, quando a concentração de xilose atinge determinado nível e a oxigenação aumenta, alguns microrganismos preferem utilizar o etanol produzido como fonte de carbono, isso foi demonstrado em microrganismos como *P. tannophilus* (MALESZKA E SCHNEIDER, 1982), *Candida tropicalis* e *Candida guilliermondii* (SCHIRMER-MICHEL et al., 2008).

Quanto à conversão das hexoses a etanol, a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é o microrganismo que possui aplicação bem sucedida na produção industrial de etanol a partir de caldo de cana-de-açúcar e melaços no Brasil, pois é capaz de fermentar hexoses de forma rápida e eficiente (MÉRICO et al., 2007). Porém a sua utilização na produção de etanol de segunda geração, sobre hidrolisados que contém pentoses e hexoses não é eficiente, já que essa levedura não consegue converter pentoses a etanol. Várias pesquisas atualmente objetivam o desenvolvimento de cepas modificadas de *S. cerevisiae* que consigam utilizar as pentoses presentes nos hidrolisados (HANH – HAGERDAL et al., 2007).

*Zymomonas mobilis*, bactéria gram-negativa, é outro exemplo de microrganismo com enorme potencial industrial para conversão a etanol. No entanto, assim como *S. cerevisiae*, *Z. mobilis* não é capaz de fermentar pentoses a etanol. Sua gama de substratos é limitada,

utilizando apenas três fontes de carbono: frutose, glicose e sacarose (SAHA, 1997). Sendo assim, diversas pesquisas têm desenvolvido sistemas de co-fermentação, utilizando microrganismos que convertam simultaneamente glicose e xilose a etanol. Estudo feito por Nan Fu et al. (2009) utilizando co-cultura de células de *Z. mobilis* imobilizadas e células de *P. stipitis* livres em fermentador modificado, preenchido com uma mistura de xilose e glicose (20 e 30 g L<sup>-1</sup>, respectivamente), obteve produtividade volumétrica de etanol de aproximadamente 1,3 g L<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup> e rendimentos de etanol de 0,49-0,50 g g<sup>-1</sup>, em 19 horas. Quando utilizado o mesmo co-cultivo em hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar os resultados para o rendimento de etanol foram de 0,49 g g<sup>-1</sup> em 40 horas de cultivo.

As co-fermentações têm sido bastante utilizadas tanto na forma livre como imobilizada, com o objetivo de utilizar as pentoses e as hexoses presentes em hidrolisados lignocelulósicos (HINFRAY et al., 1995). Meios de fermentação com misturas de açúcares têm tido sucesso na conversão a etanol utilizando leveduras geneticamente modificadas e bactérias (MONIRUZZAMAN, 1996). Porém outro investimento além da produção de etanol pode ser a formação simultânea de xilitol por consórcios de leveduras como *C. tropicalis* e *S. cerevisiae* (LATIF E RAJOKA, 2001). Desta forma o resíduo é totalmente bioconvertido a produtos de grande interesse comercial, tornando essa tecnologia mais rentável.

### **2.2.2. Bioconversão de hidrolisados lignocelulósicos a Xilitol**

Uma alternativa de formação de produtos de alto valor agregado através de hidrolisados lignocelulósicos, dentro do conceito de biorrefinaria, é a produção de xilitol. Este álcool pentahidroxilado possui grande importância econômica, pois pode ser utilizado como substituto de açúcares convencionais. Isso devido seu elevado poder adoçante, comparável ao da sacarose (PEPPER; OLINGER, 1988), sua propriedade anticariogênica,

uma vez que não é fermentado pela microbiota bucal e sua propriedade cariostática, pois estabiliza cáries já existentes (MAEKINEN, 1979). Esse adoçante é indicado para pacientes com diabetes devido sua lenta absorção e participação das rotas metabólicas independentemente de insulina, podendo, portanto, ser utilizado como substituto de glicose (YLIKAHRI, 1979). Essas características fazem do xilitol um insumo de grande importância nas indústrias alimentícia, odontológica e farmacêutica.

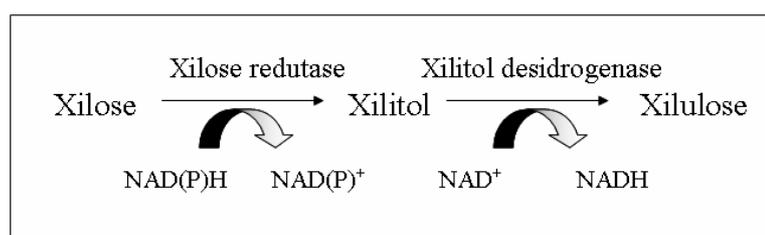
Quanto às aplicações tecnológicas do xilitol. O mesmo possui dissolução endotérmica, ou calor negativo de dissolução ( $-36,6 \text{ cal g}^{-1}$ ), o que é uma característica desejável em inúmeros alimentos, tais como, gomas de mascar, balas, refrigerantes, sorvetes, entre outros (NIGAM E SINGH, 1995), pois confere excelente sabor e sensação de refrescância nas cavidades bucal e nasal, similares a do mentol (EMODI, 1978). O xilitol não participa de reações de escurecimento do tipo “Maillard”, pois não possui grupos aldeídicos e cetônicos em sua molécula, fato que o torna apropriado na formulação de produtos que necessitem de altas temperaturas durante sua produção e nos quais essas reações sejam indesejáveis (PARAJÓ et al., 1998a).

O xilitol é produzido em escala comercial por um processo químico, a hidrogenação catalítica de xilose pura presente em hidrolisados hemicelulósicos. Devido seu alto custo de produção, dificuldades de purificação e o impacto no meio ambiente, o uso do xilitol como adoçante ainda é muito limitado (HYVÖNEN et al., 1982). Fato que encoraja o desenvolvimento de tecnologias alternativas, como é o caso da produção biotecnológica do mesmo.

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).

Em geral, dentre os microrganismos, as leveduras são consideradas as melhores produtoras de xilitol. Sendo que, as leveduras do gênero *Candida* estão entre as maiores produtoras (Ex. *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. biodinii* e *C. mogii*) (WINKELHAUSEN E KUZMANOVA, 1998). Outro gênero que se destaca na produção de xilitol é *Debaryomyces*, em especial, *D. hansenii* (PARAJÓ et al., 1998).

A produção de xilitol por essas leveduras é possível porque elas possuem xilose-reductase, a qual, em presença do co-fator NADPH, catalisa a redução da xilose a xilitol como primeiro passo no metabolismo da xilose (WINKELHAUSEN E KUZMANOVA, 1998). Logo após, ocorre a oxidação do xilitol a D-xilulose mediante xilitol-desidrogenase na presença do co-fator  $\text{NAD}^+$  (Figura 4).



**Figura 4** - Representação esquemática das primeiras etapas da metabolização da D-xilose em leveduras.

Assim, sob condições limitadas de oxigênio, não há a completa re-oxidação de NADH a  $\text{NAD}^+$ , promovendo um desequilíbrio redox. A baixa concentração de  $\text{NAD}^+$  diminui a oxidação do xilitol a xilulose, induzindo a excreção de xilitol ao meio de cultura (DU PREEZ et al., 1989).

Em microaerofilia, pode ocorrer a formação não só do xilitol, mas também de etanol, ou de ambos, dependendo, basicamente, dos co-fatores das enzimas envolvidas nas reações de metabolização da xilose, bem como, a regeneração de tais co-fatores, de acordo com as condições de oxigênio empregadas ao longo do cultivo (BRUINENBERG et al., 1984; PANAGIOTOU et al., 2005). 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  $\text{NAD}^+$ , recuperando, independentemente, da cadeia respiratória, o co-fator 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.

Além da aeração, outros fatores são importantes para produção biotecnológica de xilitol, são eles: concentração do inóculo, pH, temperatura, concentração inicial de xilose, tipo de fonte de nitrogênio, presença de glicose 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 et al., 1998).

De uma forma geral, o fornecimento de oxigênio é o parâmetro chave que determina se ocorrerá maior produção de xilitol ou maior crescimento celular (ROBERTO et al., 1999).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. CASCA DE SOJA**

A casca de soja (*Glycine max*) utilizada nos experimentos foi cedida pela Companhia Solae do Brasil Indústria e Comércio de Alimentos Ltda., localizada no município de Esteio, RS. A casca foi moída em partículas menores que 1 mm de diâmetro, ensacada e armazenada a temperatura ambiente até a realização das hidrólises.

#### **3.2. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA CASCA DE SOJA**

A análise da casca de soja foi feita de acordo com a metodologia descrita por Dunning e Dallas (1949), que se fundamenta na sacarificação quantitativa dos polissacarídeos de diferentes matérias-primas vegetais. A umidade da casca foi determinada em balança de infravermelho (OHAUS) por 30 minutos a 105°C. Aproximadamente 2g de casca (massa seca) foram pesadas e transferidas para um béquer ao qual foram adicionados 10 mL de ácido sulfúrico 72% (p/p). A mistura foi agitada continuamente com bastão de vidro e climatizada em banho-maria a 50 °C por 7 minutos. Nessa etapa, denominada hidrólise principal, ocorreu o rompimento das fibras de celulose em oligômeros. Após completar o tempo da hidrólise, a reação foi interrompida com adição de 275 mL de água destilada e o conteúdo foi transferido para um frasco de Erlenmeyer de 500 mL. Em uma etapa de pós-hidrólise, a suspensão foi autoclavada a 121 °C por 15 minutos. Após resfriamento, a suspensão foi filtrada em papel de filtro, transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 500 mL e o volume foi completado com água destilada.

O resíduo sólido, (após várias lavagens) foi seco em estufa a 105 °C e pesado até massa constante. A diferença entre a massa seca do resíduo e a massa seca inicial da amostra foi utilizada para determinar a porcentagem de lignina presente na casca de soja. A fração líquida obtida foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinar as concentrações dos componentes do material lignocelulósico (ácido glucurônico, celobiose, glicose, xilose, arabinose e ácido acético) utilizados para o cálculo da porcentagem de celulose e hemicelulose da casca de soja (GOUVEIA, et al., 2009).

Para determinação das cinzas, 1g de casca de soja (massa seca) foi submetida a um tratamento térmico em mufla elétrica a 600 °C, durante 4 horas, até combustão total da matéria orgânica. Em seguida, esta foi pesada até obter-se massa constante (SILVA; QUEIROZ, 2005).

O teor de proteína foi determinado conforme metodologia descrita por HORWITZ (1975), utilizando o método de Kjeldahl, empregando-se fator de 6,25 para casca de soja.

A análise de minerais foi feita utilizando a técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP –OES). Foram determinados o fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, cobre, zinco, ferro, manganês, sódio, cromo, alumínio e bário.

### **3.3. CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE DA CASCA DA SOJA**

A hidrólise ácida diluída foi avaliada quanto a alguns parâmetros como, a influência da razão sólido-líquido, da concentração de ácido sulfúrico e da temperatura (variáveis independentes), bem como os efeitos de possíveis interações entre estas, sobre a hidrólise dos polissacarídeos presentes na casca da soja. O primeiro planejamento experimental realizado baseou-se em um planejamento fatorial completo  $2^3$  com três repetições no ponto central. Os

valores das variáveis independentes estão apresentados na Tabela 1, onde (-1), (0) e (+1) representam o menor nível, o ponto central e o maior nível, respectivamente. A Tabela 2 ilustra a matriz experimental do planejamento estudado.

**Tabela 1** - Níveis dos fatores utilizados no planejamento fatorial completo  $2^3$  com três repetições no ponto central.

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
Temperatura (°C)	98	110	122
Líquido/Sólido ( $\text{g g}^{-1}$ sólido seco)	8,8	10	11,2
Concentração de $\text{H}_2\text{SO}_4$ ( $\text{mmol g}^{-1}$ sólido seco)	1,2	1,5	1,8

**Tabela 2** - Esquema da matriz do planejamento fatorial  $2^3$  com três repetições no ponto central

Ensaio	Variáveis		
	Temperatura (°C)	Razão Líquido-Sólido ( $\text{g g}^{-1}$ )	Concentração de ácido ( $\text{mmol g}^{-1}$ sólido seco)
1	+1	+1	-1
2	-1	-1	-1
3	+1	-1	+1
4	+1	-1	-1
5	-1	+1	-1
6	-1	-1	+1
7	-1	+1	+1
8	0	0	0

Os ensaios foram conduzidos em ampolas de inox A151 316 com capacidade para 100 mL de solução, contendo casca de soja previamente moída e solução de ácido sulfúrico. Os reatores foram imersos em banho de silicone sob as diferentes temperaturas por períodos de 10, 20, 30 e 40 minutos. Posteriormente a fração líquida obtida foi analisada por CLAE.

Um segundo planejamento experimental foi realizado abrangendo apenas as variáveis significativas para liberação de açúcares. Neste planejamento fatorial as variáveis independentes avaliadas foram a concentração de ácido sulfúrico e a temperatura, bem como

os efeitos de possíveis interações entre estas, sobre a hidrólise dos polissacarídeos presentes na casca da soja. A relação sólido-líquido foi fixada em 1:10. O segundo planejamento experimental baseou-se em um planejamento composto central  $2^2$  com três repetições no ponto central. Os valores das variáveis independentes estão apresentados na Tabela 3, onde o menor nível, o ponto central e o maior nível estão representados por (-1), (0) e (+1), respectivamente. A Tabela 4 ilustra a matriz experimental do planejamento estudado.

**Tabela 3** - Níveis dos fatores utilizados no planejamento central composto  $2^2$  com três repetições no ponto central.

Fatores	Níveis				
	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Temperatura (°C)	110	118	135	153	160
Concentração de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (mmol g <sup>-1</sup> sólido seco)	1,5	1,7	2,2	2,8	3

**Tabela 4** - Esquema da matriz do planejamento central composto  $2^2$  com três repetições no ponto central.

Ensaio	Variáveis	
	Temperatura (°C)	Concentração de ácido (mmol g <sup>-1</sup> sólido seco)
1	-1	-1
2	+1	-1
3	-1	+1
4	+1	+1
5	-1,41	0
6	+1,41	0
7	0	+1,41
8	0	-1,41
9	0	0

Todos os experimentos foram realizados em duplicatas para correr ao acaso. Este desenho permitiu a estimativa da significância dos parâmetros e sua interação com o F-teste. Os resultados foram avaliados com o software Statistica 7,0.

A fim de definir o melhor tratamento para a maior liberação de açúcares e menor formação de ácido acético, furfural, lignina solúvel e HMF foi desenvolvida uma função objetivo utilizando o software Matlab 6.0.

### 3.4. OBTENÇÃO DO HIDROLISADO HEMICELULÓSICO DE CASCA DE SOJA

A casca de soja foi hidrolisada em autoclave (PHOENIX) utilizando frascos Erlenmeyers de 2L, contendo 1L de solução. A hidrólise foi realizada nas seguintes condições: 1,8 mmol g<sup>-1</sup> sólido seco de ácido sulfúrico, 1:8,8 de relação sólido-líquido, temperatura de 122°C e tempo total de reação 60 minutos (rampa de aquecimento: 10 minutos, tempo de reação a 122°C: 40 minutos e rampa de resfriamento: 10 minutos). O hidrolisado resultante foi resfriado em banho de gelo e centrifugado a 11.000 xg por 20 minutos (HITACHI, HIMAC CR 21E). O sobrenadante foi estocado em refrigerador a 4 °C para posterior concentração e tratamento.

### 3.5. CONCENTRAÇÃO

O hidrolisado foi concentrado quatro vezes em rota-evaporador (Heidolph, Laborota 4000) conectado a bomba de vácuo (Nova técnica) e a um banho refrigerado (B. Braun Biotech International, Thermomix® BM). A temperatura de trabalho do rota-evaporador foi de 70 °C.

### 3.6. MICRORGANISMOS, MANUTENÇÃO E INÓCULO

As leveduras utilizadas nos experimentos foram *Saccharomyces cerevisiae* (ICV d953), *Candida guilliermondii* (NRRL Y-2075), *Candida tropicalis*, *Candida utilis*, *Candida kefyri*, *Candida silvicola* e *Debaryomyces hansenii* (ATCC 36239) e a bactéria *Zymomonas mobilis* (ATCC 29191), cepas pertencentes à coleção do Bioteclab. As leveduras foram mantidas em tubo inclinado contendo ágar YM (g L<sup>-1</sup>): extrato de levedura, 3; extrato de malte, 3; peptona, 5; glicose, 10; ágar, 20. *Zymomonas mobilis* foi mantida em meio líquido

semi-sintético contendo ( $\text{g L}^{-1}$ ):  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,01;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3,5; extrato de levedura, 7,5; glicose, 20. O meio utilizado para preparo do inóculo continha ( $\text{g L}^{-1}$ ): extrato de levedura, 3; extrato de malte, 3; peptona, 5; glicose, 30. A glicose foi esterilizada separadamente em autoclave a  $121^\circ\text{C}$  por 15 minutos. Os inóculos foram preparados através do cultivo de cada microrganismo separadamente em frasco Erlenmeyer de 1L contendo 200 mL de meio YM. As células foram cultivadas em agitador orbital (Marconi, MA 830) a 180 rpm,  $30^\circ\text{C}$  por 24 horas. Em seguida as células foram recolhidas por centrifugação a  $3000 \times g$  por 30 minutos. O *pellet* formado foi lavado com solução salina e ressuspenso diretamente no mesmo meio de fermentação. Os inóculos dos cultivos isolados e dos consórcios foram padronizados para que a concentração celular da suspensão atingisse densidade óptica ( $\text{DO}_{600}$ ) igual a 1. O volume de inóculo perfazia 10% do volume total de cultivo em todos os frascos utilizados nos experimentos.

### 3.7. MEIO E CONDIÇÕES DE FERMENTAÇÃO

Os experimentos foram realizados em frascos agitados e em biorreatores de cultivo submerso. Para os ensaios em frascos agitados utilizou-se meio semi-sintético composto por ( $\text{g L}^{-1}$ ): extrato de levedura, 5; peptona, 10; xilose, 35; arabinose, 30 e glicose, 10. Para o ensaio em biorreatores de cultivo submerso utilizou-se como meio o hidrolisado hemicelulósico de casca de soja e para efeitos de comparação de cinética de cultivo, biorreatores contendo meio semi-sintético simulando a composição do hidrolisado foram realizados. O meio semi-sintético era composto por ( $\text{g L}^{-1}$ ): xilose, 25; arabinose, 15; glicose, 6; peptona, 5; extrato de levedura, 3 e 0,2 % de tween 80. O pH dos meios de cultivo foram previamente corrigidos, nos cultivos empregando consórcios de microrganismos e nos cultivos que utilizaram microrganismos isoladamente para 5,5 e 6, respectivamente. A correção do pH foi feita com a adição de hidróxido de sódio (NaOH) sólido sob agitação.

### **3.7.1. Ensaio em Frascos agitados**

Os ensaios foram conduzidos em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 25 mL de meio semi-sintético descrito no item 3.7, em agitador orbital (Marconi, MA 830) a 100 rpm, 30 °C por 60 horas. As amostras foram retiradas em 0, 6, 12, 24, 36, 48 e 60 horas para determinação da concentração celular (peso seco) e de açúcares, xilitol e etanol no meio, através de análise cromatográfica. O experimento foi conduzido em duplicata e utilizou-se um Erlenmeyer para cada ponto de análise.

### **3.7.2. Ensaio em biorreatores de cultivo submerso utilizando consórcios de microrganismos e isolados**

As fermentações foram realizadas em biorreatores de cultivo submerso com capacidade total para 2L (Biostat B model, B. Braun Biotech International, Alemanha), contendo 1,3 mL de meio sob condições anaeróbias e microaerófilas (1 vvm). Os fermentadores foram equipados com eletrodo de oxigênio dissolvido, termopar e agitador.

Os cultivos realizados com os consórcios foram mantidos a temperatura de 30 °C e a agitação foi de 200 e 300 rpm para a condição anaeróbia e microaerófila, respectivamente. O tempo de cultivo foi de 132 horas e as amostras foram retiradas em intervalos de 12 horas.

Nas fermentações conduzidas com microrganismos isolados a temperatura foi de 30°C e a agitação foi de 300 rpm, sob condições microaerófilas (1vvm). O tempo de cultivo foi de 120 horas e as amostras foram retiradas em intervalos de 12 horas. Todos os experimentos foram feitos em duplicata.

A concentração celular foi determinada através método de contagem de unidades formadoras de colônia (UFC), a concentração de açúcares, xilitol e etanol no meio foram determinadas através de análise cromatográfica.

### 3.8. MÉTODOS ANALÍTICOS

A caracterização da casca de soja foi feita por análises químicas (teor de lignina, celulose, hemicelulose, cinzas, minerais e proteína). A caracterização dos hidrolisados (original e concentrado) foi feita pela determinação das concentrações de açúcares (xilose, glicose e arabinose), concentração de inibidores (ácido acético, furfural e hidroximetilfurfural), pressão osmótica e pH. Os resultados foram descritos na forma de gráficos e tabelas.

#### 3.8.1. Determinação do teor de lignina

O teor de lignina foi calculado conforme descrito por Rocha (2000):

$$\% \text{ de lignina} = \frac{\text{massa da lignina (g)} \times 10000}{\text{massa da amostra (g)} \times \text{massa seca da amostra (g)}} \quad (\text{Eq. 1})$$

### 3.8.2. Determinação do teor de celulose e hemicelulose

Os teores de celulose e hemicelulose foram calculados conforme descrita por Irick et al. (1988).

$$\% \text{ de celulose} = \frac{\text{glicose}(\text{g L}^{-1}) \times 50 \times 100 \times FC \times FP}{\text{massa amostra (g)} \times \text{massa seca amostra (\%)}} \quad (\text{Eq. 2})$$

Em que: FC = fator de conversão da celulose (0,9)

FP = fator de perda por hidrólise para celulose (1,055)

$$\% \text{ hemicelulose} = \frac{\left[ \text{xilose (g L}^{-1}) \times 50 \times \text{arabinose (g L}^{-1}) \times 50 \right] \times 100 \times FC \times FP}{\text{Massa amostra (g)} \times \text{amostra seca (g)}} \quad (\text{Eq. 3})$$

Em que: FC = fator de conversão da hemicelulose (0,88)

FP = fator de perda por hidrólise para hemicelulose (1,155)

### 3.8.3. Determinação dos parâmetros fermentativos e de hidrólise

As taxas de conversão de açúcares ( $YS \text{ g g}^{-1}$ ) e a eficiência de hidrólise ( $\eta$ , %) foram calculados pelas seguintes equações:

$$YS = (CV / M) \times 100 \quad (\text{Eq. 4})$$

$$\eta = (YS / Y_{\max}) \times 100 \quad (\text{Eq. 5})$$

Em que:  $C$  = concentração dos componentes da fase líquida ( $\text{g L}^{-1}$ );

$M$  = massa seca de casca de soja utilizada no experimento (g);

$V$  = volume da solução líquida (L);

$Y_{\text{max}}$  = taxa máxima de açúcares recuperados (g por 100 g matéria seca).

#### 3.8.4. Determinação do teor de cinzas

A determinação do teor de cinzas foi realizada conforme descrito por Silva e Queiroz (2005):

$$\% \text{ cinzas} = \frac{\text{massas cinzas (g)} \times 100}{\text{massa seca amostra (\%)}} \quad (\text{Eq. 6})$$

#### 3.8.5. Determinação da concentração celular

Para o preparo dos inóculos foi adotado o método de espectrofotometria. As concentrações celulares foram determinadas por turbidimetria em espectrofotômetro (Ultrospec 3100 pro) no comprimento de onda de 600 nm. A avaliação do crescimento celular ( $\text{células mL}^{-1}$ ) dos experimentos realizados em frascos agitados foi feita por biomassa seca, utilizando estufa (Fanem 315 SE) a  $75^\circ\text{C}$  até obtenção de peso constante. A avaliação celular ( $\text{células mL}^{-1}$ ) nos experimentos realizados em biorreatores foi determinada através do método de contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) e para os biorreatores contendo meio semi-sintético a avaliação celular ainda foi feita por biomassa seca.

### **3.8.6. Determinação da concentração de açúcares, xilitol, etanol e ácido acético**

Os teores de açúcares, xilitol, etanol e ácido acético foram determinados por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência), em equipamento Shimadzu, empregando-se coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H a 45°C, utilizando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,0005M) como eluente, com fluxo de 0,6 mL min<sup>-1</sup> e detector por índice de refração. O volume de amostra injetada foi de 20 µL. As amostras foram previamente diluídas e filtradas em filtro “Sep-Pack” C18 (Millipore).

### **3.8.7. Determinação da concentração de furfural e hidroximetilfurfural**

As concentrações de furfural e hidroximetilfurfural (HMF) foram determinadas por CLAE, sob as seguintes condições: coluna Nucleosil C-18 mantida a 25 °C; detector ultravioleta/visível SPD-M20A a 276nm, tendo acetonitrila/água (2:8) com 1% de ácido acético como eluente em fluxo de 1,1 mL minuto<sup>-1</sup>. O volume de amostra injetada foi de 20 µL. As amostras foram previamente filtradas em membrana de acetato de celulose ME25 com 0,45 µL e D13 mm.

### **3.8.8. Determinação da concentração dos fenóis totais**

A concentração de fenóis totais foi determinada pela quantificação da lignina solúvel em meio ácido de acordo com a metodologia proposta por Rocha (2000):

Uma alíquota do hidrolisado foi alcalinizada até pH 12 pela adição de solução de hidróxido de sódio 6 M e diluída com água destilada de forma a se obter uma leitura inferior a 1 unidade de absorbância. A absorbância desta solução foi determinada em espectrofotômetro em um comprimento de onda de 280 nm, utilizando-se como referência

solução de hidróxido de sódio 6 M. A concentração de lignina foi calculada por meio das equações 5 e 6:

$$C_{LIG} = 4,187 * 10^{-2} ( A_{LIG\ 280} - A_{PD\ 280} ) - 3,279 * 10^{-4} \quad (\text{Eq. 7})$$

Em que:  $C_{LIG}$  = concentração de lignina solúvel em meio ácido ( $\text{g L}^{-1}$ ) e

$A_{LIG}$  = absorvância de todos os compostos em 280 nm.

$$A_{PD\ 280} = C_F \beta_F + C_{HMF} \beta_{HMF} \quad (\text{Eq. 8})$$

Em que:  $C_F$  e  $C_{HMF}$  = concentração de furfural e HMF determinadas por CLAE

$\beta_F$  e  $\beta_{HMF}$  = coeficientes a 280 nm de furfural ( $146,85 \text{ L g}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) e HMF ( $114 \text{ L g}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ).

### 3.8.9. Determinação de pH e Pressão Osmótica

O pH foi determinado em pHmetro (PHTEK, PHS 3B) e a pressão osmótica foi determinada em osmômetro (VAPRO 5520).

### 3.8.10. Determinação de proteína

A análise de proteína foi determinada pelo método de Kjeldahl (HORWITZ, 1975), o qual se baseia na transformação do nitrogênio da proteína em borato de amônio para posterior quantificação com solução ácida padronizada. Inicialmente a amostra foi digerida, para isso foram pesadas 700 mg de casca de soja previamente moída em tubos digestores. Adicionou-se 2,5 g de sulfato de sódio e entre 12 e 14 mL da solução sulfo-cúprica. Logo após as

amostras foram colocadas no aparelho digestor por 50 minutos a 240 °C. Após a digestão da amostra, entre 12 e 14 mL de uma solução de ácido bórico a 4% foi vertida em Erlenmeyer de 250 mL, adicionou-se 40 mL de água destilada e 3 gotas de indicador Taschiro. Conectou-se o Erlenmeyer ao destilador de modo que a ponteira ficasse submersa no líquido. Em seguida, passou-se quantitativamente a amostra digerida para um balão de destilação Kjeldahl de 800 mL, com o auxílio de água destilada, novamente foram colocadas 3 gotas de indicador Tashiro. Adicionou-se hidróxido de sódio a 40 % até a obtenção da coloração verde. O balão foi então acoplado ao destilador, deixando-se destilar até atingir a marca de 125 mL no Erlenmeyer. Logo após a ponta que estava submersa foi retirada e destilou-se novamente até atingir a marca de 150 mL. Por fim, a solução destilada foi titulada com solução de ácido sulfúrico 0,1 N até a viragem da cor verde para roxo. A equação 7 foi utilizada para calcular a percentagem de proteína da amostra. O resultado é a média de 3 experimentos.

$$\% \textit{proteína} = \frac{K \times V \times \textit{Fator}}{P} \quad (\text{Eq. 9})$$

Em que:  $K = FC \times 0,0014 \times 100$

$P$  = peso da amostra

$FC$  = fator de correção da solução de ácido sulfúrico a 0,1 N (0,20868)

$V$  = volume da solução de ácido sulfúrico 0,1 N gasto

$\textit{Fator}$  = fator de conversão do nitrogênio para proteína (6,25)

### **3.8.11. Determinação de minerais**

A análise de minerais foi feita pelo Laboratório de Análises de Solo (UFRGS), utilizando a técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP – OES). A metodologia aplicada para abertura da amostra foi a digestão úmida nítrico-perclórica. Os minerais analisados foram os seguintes: fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, cobre, zinco, ferro, manganês, sódio, cromo, alumínio e bário. Os resultados foram expressos na amostra seca a 65 °C e são a média de duas determinações.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA CASCA DE SOJA

A composição química da casca de soja pode variar conforme o processamento e condições de crescimento do grão. A Tabela 5 apresenta a composição química da casca de soja empregada no presente trabalho

**Tabela 5** - Composição química casca de soja.

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (%)</b>
Celobiose	1,6
Ácido glucurônico	2,0
Glicose	39,7
Xilose	19,6
Arabinose	5,9
Ácido acético	0,6
Hidroximetilfurfural	0,4
Furfural	0,8
Lignina insolúvel	3,4
Lignina solúvel	5,7
Extrativos	3,2
Cinzas	0,6
Insolúveis	10,7
Proteína	13,1

O principal componente da casca de soja é a glicose, seguido de xilose e arabinose, assim como na maioria dos resíduos agroindustriais. Um aspecto que torna a casca de soja um resíduo agroindustrial interessante para utilização no processo de bioconversão de materiais lignocelulósicos a etanol é o seu baixo teor de lignina total (9,1%). Outros resíduos que vem sendo empregados em processos de hidrólise para posterior conversão a etanol como bagaço de cana de açúcar, bagaço de malte, palha de arroz e palha de trigo possuem em torno de 18,1%, 27,8%, 17,2% e 20% de lignina, respectivamente. (SUN et al., 2004; MUSSATTO E ROBERTO, 2006; SUN et al., 2005; MUSSATTO E ROBERTO, 2006). O baixo teor de

lignina da casca de soja pode facilitar o processo de hidrólise ácida diluída, uma vez que torna a celulose e a hemicelulose mais disponíveis ao ataque do ácido, e diminuir a geração dos produtos de degradação muitas vezes tóxicos aos microrganismos.

O teor de proteína da casca de soja utilizada nesse trabalho foi de 13,1%, superior ao teor encontrado neste mesmo resíduo por Mielenz et al. (2009) e Miron et al., (2001) de 10,21% e 10,1%, respectivamente e inferior ao encontrado por Corredor et al. (2008) de 14,2%. O teor de proteína da casca de soja torna este um resíduo bastante empregado na alimentação animal (BARBOSA et al., 2008).

Além da porção de celulose, hemicelulose, lignina e proteína, a casca de soja possui 0,6% de cinzas, teor inferior ao encontrado em bagaço de malte de cervejaria, que foi de 4,6% (MUSSATTO E ROBERTO, 2006), ou de palha de arroz, que foi de 11,4% (ROBERTO et al., 2003).

A Tabela 6 apresenta as concentrações dos minerais existentes na casca da soja analisada por ICP-OES.

**Tabela 6** – Composição de minerais da casca da soja.

<b>Minerais</b>	<b>Concentração % (mg Kg<sup>-1</sup>)</b>
Fósforo	0,0019
Potássio	0,013
Cálcio	0,0057
Magnésio	0,0026
Enxofre	0,0014
Ferro	0,0013
Zinco	61
Cobre	9
Manganês	30
Sódio	10
Cromo	3
Alumínio	713

Vários minerais estão presentes na composição da casca de soja. Dentre os avaliados o alumínio foi encontrado em maior concentração, seguido de zinco e manganês. Alguns desses minerais são considerados metais pesados. No entanto, metais como cobre, manganês e zinco

são necessários aos microrganismos em pequenas quantidades, já que, muitos destes funcionam como co-fatores enzimáticos. Porém, níveis excessivos desses elementos podem ser extremamente tóxicos. MUSSATTO E ROBERTO (2004) reportaram que metais pesados podem inibir a produção de enzimas nas rotas metabólicas dos microrganismos. Os efeitos dos íons ferro, cromo, níquel e cobre no crescimento e assimilação de xilose por *P. tannophilus* foram avaliados por Watson et al. (1984). Quando ferro, cromo e cobre estavam presentes em quantidades entre 4 e 150 mg L<sup>-1</sup> uma pequena diminuição no crescimento foi observada, enquanto que níquel na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> diminuiu o crescimento em 60%. Quanto ao alumínio, principal metal encontrado na casca de soja, a ação tóxica do mesmo ocorre na sua forma ionizada Al<sup>+3</sup> e é caracterizada pela redução da formação de biomassa, desviando mais açúcar para formação de etanol (ARANHA, 2002). Diferentes concentrações de alumínio foram consideradas tóxicas para leveduras, de 108 mg Kg<sup>-1</sup> (RYBAROVA E ADAMEK, 1975) até valores acima de 500 mg Kg<sup>-1</sup> (WHITE, 1954). Apesar da casca de soja utilizada neste trabalho apresentar alto teor de alumínio (713 mg Kg<sup>-1</sup>) a concentração de do mesmo, encontrada no hidrolisado de casca de soja utilizado para o posterior crescimento dos microrganismos foi de aproximadamente 356 mg L<sup>-1</sup>, sendo que este hidrolisado foi concentrado 4 vezes. Todavia este valor mantém-se em uma faixa aceitável de toxicidade.

A comparação entre a composição química da casca de soja com outros resíduos lignocelulósicos agroindustriais utilizados para a bioconversão a etanol, avaliados na literatura, encontra-se na Tabela 7.

**Tabela 7** - Comparação entre a composição química da casca de soja utilizada neste trabalho com outros resíduos lignocelulósicos agroindustriais e com outras composições da mesma, descritas na literatura.

<b>Resíduo Lignocelulósico</b>	<b>Celulose (%)</b>	<b>Hemicelulose (%)</b>	<b>Lignina Total (%)</b>	<b>Referência</b>
Casca de soja	39,7	25,5	9,1	Este trabalho
Palha de trigo	31	26	24	Canilha, 2006
Palha de arroz	43,5	22	17,2	Roberto et al., 2003
Bagaço de malte	17	28	23	Mussato e Roberto 2006
Bagaço de cana	38,9	26,2	23,9	Laser et al., 2002
Casca de soja	51	16	ND	Miron et al., 2001
Casca de soja	36,4	12,5	18,2	Corredor et al., 2008
Casca de soja	38,4	10,2	2,8	Mielenz et al., 2009

\*ND = Não descrito

Conforme pode ser observado na Tabela 7, a casca de soja comparada aos outros resíduos descritos na literatura é um resíduo bastante promissor para bioconversão a produtos de alto valor agregado. O teor de açúcares fermentescíveis na casca de soja foi de 65,2%, semelhante aos valores encontrados em bagaço de cana (65,1%) e a palha de arroz (65,5%) e superior aos teores de açúcares descritos para resíduos como a palha de trigo (57%) e bagaço de malte (45,9%).

Quando comparamos a composição da casca de soja utilizada neste trabalho com as demais cascas de soja descritas na literatura (Tabela 7) pode-se observar que a quantidade de celulose foi semelhante às descritas por Corredor et al. (2008) e Mielenz et al. (2009), porém inferiores a descrita por Miron et al., 2001. Os valores referentes à hemicelulose foram superiores aos descritos na literatura, já para lignina total valores distintos foram encontrados pelos diferentes autores. A diferença entre a quantidade dos componentes dos materiais lignocelulósicos avaliados pode estar associada à origem da casca, as diferenças na classificação e também a diferenças entre as técnicas de análise.

## 4.2. CONDIÇÕES DE HIDRÓLISE DA CASCA DE SOJA

### 4.2.1. Identificação dos fatores que influenciam a hidrólise da casca de soja

Nesta primeira etapa, a hidrólise da casca de soja foi realizada em reatores de aço-inox, testando-se as seguintes variáveis de hidrólise ácida diluída: temperatura, relação sólido-líquido e concentração de ácido sulfúrico. Foi realizado um planejamento fatorial completo  $2^3$ , com três repetições no ponto central, com o objetivo de identificar os fatores que influenciavam nas concentrações finais dos açúcares (glicose, xilose e arabinose), furfuraldeídos (furfural e HMF) e ácido acético, obtidas após a hidrólise ácida diluída da casca da soja.

Tendo em vista o uso dos hidrolisados em processos de bioconversão, faz-se oportuno mencionar que:

1) Furfural e HMF são produtos de degradação de xilose e glicose, respectivamente e podem ser degradados a ácido fórmico e levulínico (PALMQVIST E HAHN-HÄGERDAL (2000b).

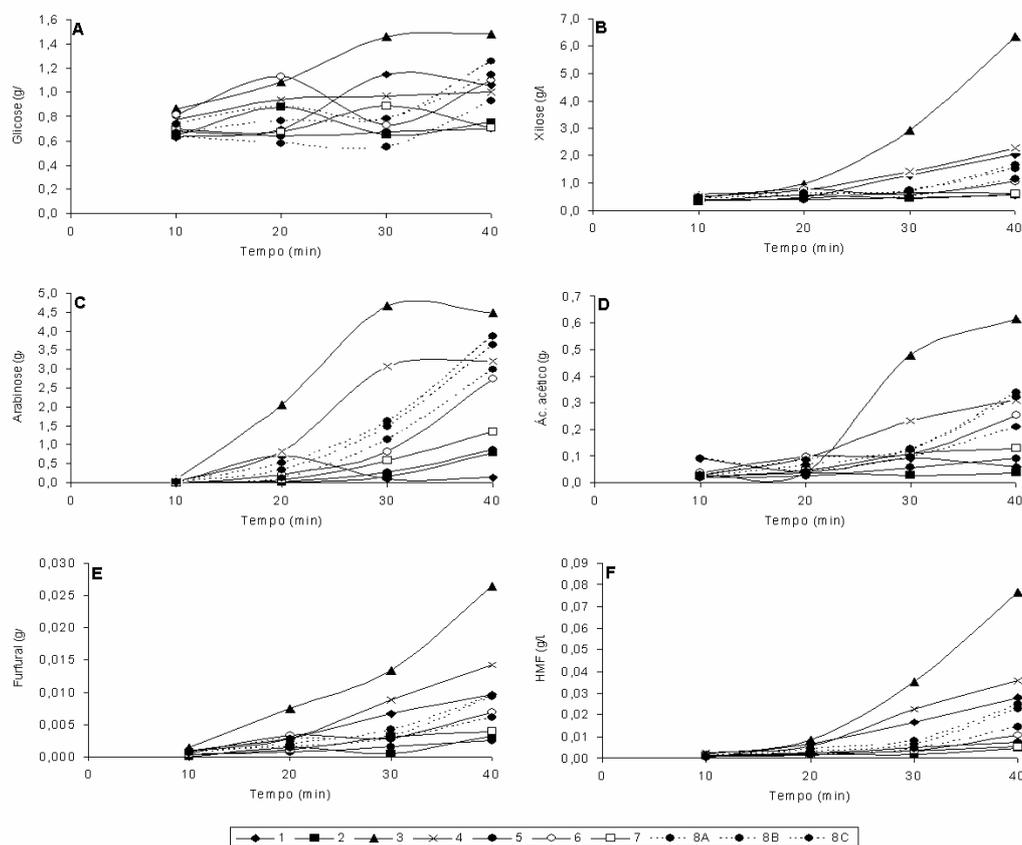
2) Concentrações de furfural e HMF entre 0,2 e 1 g L<sup>-1</sup> não foram consideradas tóxicas para levedura *C. guilliermondii* (OJAMO et al., 1988), no entanto Delgenes et al. (1996) encontraram que concentrações acima de 1 g L<sup>-1</sup> de furfural e HMF inibiam totalmente o crescimento de *P. stipitis*.

3) Grupos acetil ligados à estrutura da xilana são liberados ao meio durante a hidrólise na forma de ácido acético, que quando encontrado em concentrações superiores a 3 g L<sup>-1</sup> configura como tóxico aos microrganismos. Já os produtos de degradação da lignina (compostos fenólicos) são tóxicos aos microrganismos mesmo quando encontrados em baixas

concentrações nos hidrolisados (FELIPE et al., 1995; PARAJO et al., 1998; ROBERTO et al., 1991).

#### 4.2.1.1 Cinéticas de reação

As cinéticas de liberação dos componentes da casca de soja para cada tratamento ao longo do tempo de reação (40 minutos) encontram-se na Figura 5. Em cada tratamento os fatores avaliados foram temperatura, relação sólido-líquido e concentração de ácido.



**Figura 5** - Cinéticas de liberação de: (A) glicose; (B) xilose; (C) arabinose; (D) ácido acético; (E) furfural e (F) HMF, a partir de hidrólise ácida diluída de casca de soja durante 40 minutos. Tratamentos (temperatura, °C; relação sólido-líquido, g g<sup>-1</sup>; concentração de ácido, mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> SS): 1 (◆) 122 °C; 11,2 g g<sup>-1</sup>; 1,2 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> SS, 2 (■) 98 °C; 8,8 g g<sup>-1</sup>; 1,2 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> SS, 3 (▲) 122 °C; 8,8 g g<sup>-1</sup>; 1,8 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> SS, 4 (✕) 122 °C; 8,8 g g<sup>-1</sup>; 1,2 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> SS, 5 (●) 98 °C; 11,2 g g<sup>-1</sup>; 1,2 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> SS, 6 (○) 98 °C; 8,8 g g<sup>-1</sup>; 1,8 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> SS, 7 (□) 98 °C; 11,2 g g<sup>-1</sup>; 1,8 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> SS, 8 ponto central (●) 110 °C; 10 g g<sup>-1</sup>; 1,5 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> SS.

A liberação de glicose (Figura 5-A), xilose (Figura 5-B) e arabinose (Figura 5-C) foi maior no tratamento 3, no qual foi empregada maior temperatura e concentração de ácido e menor relação sólido-líquido ( $122\text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $8.8\text{ g g}^{-1}$ ;  $1,8\text{ mmol H}_2\text{SO}_4\text{ g}^{-1}\text{ SS}$ ), perfazendo um total de  $1,5\text{ g L}^{-1}$ ,  $6,3\text{ g L}^{-1}$  e  $4,5\text{ g L}^{-1}$ , respectivamente, após 40 minutos de reação. A eficiência deste tratamento para liberação de hemicelulose e celulose foi de 37% e 1%, respectivamente. As concentrações de HMF (Figura 5-F), furfural (Figura 5-E) e ácido acético (Figura 5-D), no tratamento 3, apresentaram um perfil crescente não ultrapassando as concentrações de  $0,08\text{ g L}^{-1}$  e  $0,03\text{ g L}^{-1}$  e  $0,6\text{ g L}^{-1}$ , respectivamente, concentrações essas inferiores aos níveis considerados tóxicos. Em todos os tratamentos aplicados neste planejamento experimental, a concentração de xilose e arabinose liberada pela hidrólise foi maior do que a quantidade de glicose. Esse resultado sugere que as condições de hidrólise testadas foram mais eficientes em hidrolisar a fração hemicelulósica da casca de soja. Segundo Cohen et al. (2005) a hidrólise da celulose em condições brandas é menos eficiente por suas características físico-químicas, este fato coincide com a baixa concentração de glicose liberada pelo tratamento 3, no entanto a arabinose foi liberada mais facilmente que a xilose da estrutura da xilana ao longo da cinética de hidrólise (KABEL et al., 2002). As concentrações dos subprodutos de degradação das pentoses e hexoses presentes nos hidrolisados foram muito baixas quando comparadas às concentrações encontradas nos hidrolisados de outros resíduos lignocelulósicos. A concentração de furfural e HMF, nos tratamentos aplicados, atingiu no máximo  $0,03\text{ g L}^{-1}$  e  $0,08\text{ g L}^{-1}$ , enquanto que em hidrolisados obtidos de palha de trigo, bagaço de malte e palha de arroz as concentrações encontradas foram  $0,53\text{ g L}^{-1}$  e  $0,09\text{ g L}^{-1}$ ;  $0,04\text{ g L}^{-1}$  e  $0,13\text{ g L}^{-1}$ ; e  $0,10\text{ g L}^{-1}$  e  $0,17\text{ g L}^{-1}$ , para furfural e HMF, respectivamente (CANILHA et al., 2006; MUSSATTO E ROBERTO, 2006 e 2004). O tratamento que gerou a maior concentração de ácido acético (Figura 5-D) no hidrolisado foi o tratamento 3, chegando a  $0,6\text{ g L}^{-1}$  em 40 minutos de reação.

Em estudo realizado por Schirmer-Michel (2008) usando 1,4% (v/v) (1,4 mmol  $\text{H}_2\text{SO}_4 \text{ g}^{-1}$  SS) e 125 °C durante 1 hora, foi relatado 76% de rendimento para liberação de pentoses em casca de soja, sem liberação significativa de hexoses, mostrando que a celulose praticamente não foi hidrolisada. As condições de hidrólise não promoveram uma relevante desidratação das pentoses, uma vez que as concentrações de furfural e ácido acético foram muito baixas. A diferença entre a eficiência relatada para liberação de pentoses por Schirmer-Michel (2008) e a encontrada para o melhor tratamento neste trabalho (122 °C; 8.8  $\text{g g}^{-1}$ ; 1,8 mmol  $\text{g}^{-1}$  SS durante 40 minutos), foi de 39%, todavia, a condição utilizada neste estudo foi menos severa do que a empregada por Schirmer-Michel (2008).

Com base nos resultados das cinéticas, observou-se que todas as variáveis analisadas (glicose, xilose, arabinose, ácido acético, furfural e HMF) aumentaram suas concentrações até os 40 minutos de reação. Os compostos conhecidos como tóxicos para o metabolismo microbiano não atingiram as concentrações consideradas inibitórias em nenhum dos hidrolisados obtidos a partir dos tratamentos avaliados. Desta forma, decidiu-se analisar estatisticamente os dados obtidos aos 40 minutos de reação.

#### ***4.2.1.2 Análises estatísticas***

Pela metodologia de planejamento de experimentos foram avaliados os efeitos significativos bem como as interações entre os três fatores que influenciaram as concentrações dos açúcares, furaldeídos e ácido acético. As Tabelas 8, 9, 10, 11, 12 e 13 apresentam as análises de variância (ANOVA) utilizadas para verificar o nível de significância estatística dos efeitos determinados sobre as variáveis independentes. As Figuras 6, 7, 8, 9, 10 e 11 mostram as superfícies de resposta geradas a partir da análise de variância para cada variável independente.

Com relação à análise estatística realizada sobre a concentração de glicose liberada durante a hidrólise da casca de soja em 40 minutos, nenhum fator isoladamente, bem como as interações entre eles, mostrou-se significativo (Tabela 8). O fato de a curvatura não ter sido significativa infere que a superfície linear obtida está de acordo com planejamento realizado.

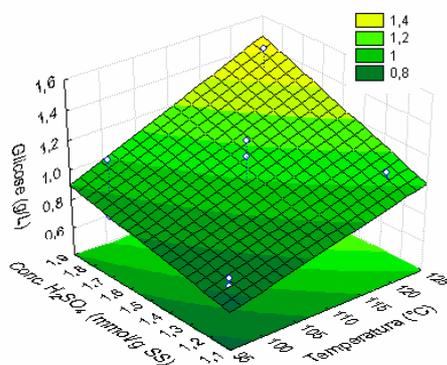
**Tabela 8** - Análise de variância para a concentração de glicose no hidrolisado obtido em 40 minutos de reação.

Fatores	SQ	GDL	MQ	F	Valor p
Curvatura	0,0197	1	0,0197	0,7293	0,4831
(1) Temperatura	0,1386	1	0,1386	5,1244	0,1519
(2) Relação sólido:líquido	0,0284	1	0,0284	1,0489	0,4134
(3) Conc. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,0593	1	0,0593	2,1919	0,2769
1 x 2	0,0028	1	0,0028	0,1044	0,7772
1 x 3	0,0043	1	0,0043	0,1604	0,7275
2 x 3	0,0284	1	0,0284	1,0515	0,4130
<b>Erro</b>	0,0541	2	0,0270		
<b>Total SS</b>	0,5711	9			

\* Significativos ao nível de 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ )

$R^2 = 0,9053$

Apesar de nenhum fator ter sido significativo, a superfície foi gerada em relação à temperatura e a concentração de ácido, devido à maior proximidade de ambos ao valor  $p \leq 0,05$  comparando ao fator relação sólido-líquido. Através da superfície de resposta (Figura 6) é possível verificar que conforme a temperatura e a concentração de ácido aumentam a concentração de glicose também aumenta.



**Figura 6** - Superfície de resposta para a concentração de glicose ( $\text{g L}^{-1}$ ) em função da temperatura e concentração de ácido, no hidrolisado de casca de soja obtido em 40 minutos de reação.

A análise de variância realizada para as concentrações de xilose mostrou que a temperatura, a concentração de ácido e a interação entre esses fatores foram significativos para a concentração deste açúcar (Tabela 9). Todavia a curvatura desta equação também foi significativa, ou seja, a superfície gerada não se enquadra no modelo linear, mostrando a necessidade da realização de pontos axiais neste planejamento.

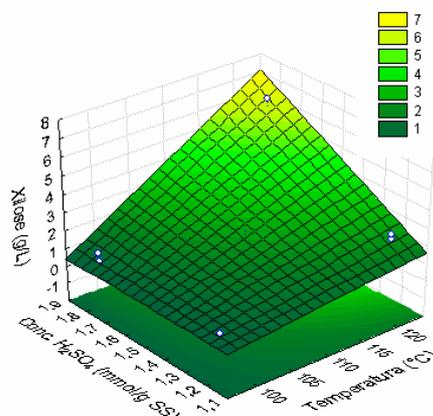
**Tabela 9** - Análise de variância para a concentração de xilose no hidrolisado obtido em 40 minutos de reação.

Fatores	SQ	GDL	MQ	F	Valor p
Curvatura	1,5766	1	1,5766	24,5361	0,0384*
(1) Temperatura	11,3743	1	11,3743	177,0101	0,0056*
(2) Relação sólido:líquido	0,1157	1	0,1157	1,8004	0,3117
(3) Conc. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4,1868	1	4,1868	65,1557	0,0150*
1 x 2	0,0125	1	0,0125	0,1946	0,7022
1 x 3	3,1700	1	3,1700	49,3322	0,0197*
2 x 3	0,0441	1	0,0441	0,6855	0,4947
<b>Erro</b>	0,1285	2	0,0643		
<b>Total SS</b>	26,2330	9			

\* Significativos ao nível de 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ )

$R^2 = 0,9951$

Contudo, a influência que os fatores significativos exercem para liberação da xilose existe, fazendo com que a concentração do mesmo aumente conforme o aumento nos níveis desses fatores (Figura 7).



**Figura 7** - Superfície de resposta para a concentração de xilose (g L<sup>-1</sup>) em função da temperatura e concentração de ácido, no hidrolisado de casca de soja obtido em 40 minutos de reação.

A análise estatística realizada para a liberação de arabinose através da hidrólise ácida diluída mostrou que a relação sólido-líquido foi significativa para a concentração desta (Tabela 10). Observou-se que a curvatura da equação foi significativa, o que indica que esta superfície se enquadraria melhor em um modelo quadrático.

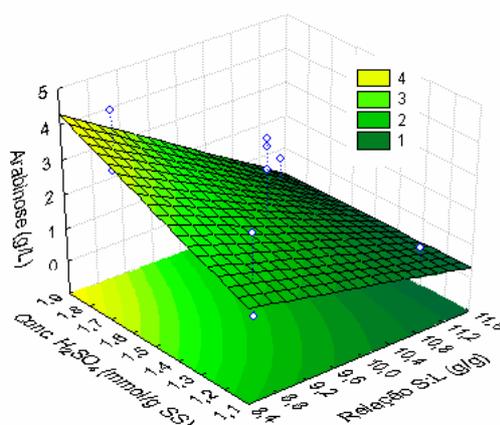
**Tabela 10** - Análise de variância para a concentração de arabinose no hidrolisado obtido em 40 minutos de reação.

Fatores	SQ	GDL	MQ	F	Valor p
Curvatura	5,5742	1	5,5742	26,8088	0,0353*
(1) Temperatura	0,2546	1	0,2546	1,2244	0,3838
(2) Relação sólido:líquido	4,9545	1	4,9545	23,8283	0,0395*
(3) Conc. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,7516	1	0,7516	3,6150	0,1976
1 x 2	2,4682	1	2,4682	11,8707	0,0749
1 x 3	0,1144	1	0,1144	0,5504	0,5355
2 x 3	0,5353	1	0,5353	2,5744	0,2498
<b>Erro</b>	0,4159	2	0,2079		
<b>Total SS</b>	20,1508	9			

\* Significativos ao nível de 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ )

$R^2 = 0,9794$

Segundo a superfície gerada (Figura 8) em função da relação sólido-líquido e da concentração de ácido pode-se analisar que conforme a concentração de ácido aumenta e a relação sólido-líquido diminui, a concentração de arabinose aumenta, ou seja, a relação sólido-líquido influencia de maneira negativa a concentração da arabinose.



**Figura 8** - Superfície de resposta para a concentração de arabinose ( $\text{g L}^{-1}$ ) em função da concentração de ácido e relação sólido:líquido, no hidrolisado de casca de soja obtido em 40 minutos de reação.

Com relação à análise estatística realizada sobre a concentração de ácido acético liberada durante a hidrólise da casca de soja em 40 minutos, nenhum fator isoladamente, bem como as interações entre eles, mostrou-se significativo (Tabela 11). O fato de a curvatura ter sido não significativa infere que a superfície linear obtida está de acordo com planejamento realizado.

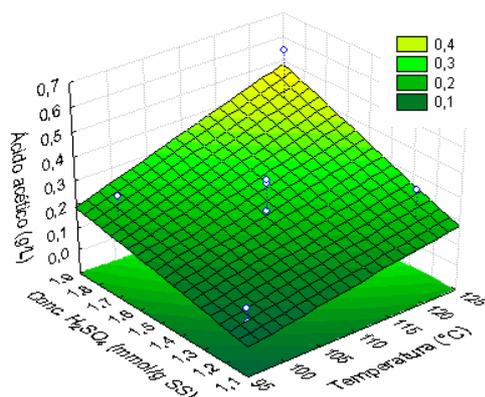
**Tabela 11** - Análise de variância para a concentração de ácido acético no hidrolisado obtido em 40 minutos de reação.

<b>Fatores</b>	<b>SQ</b>	<b>GDL</b>	<b>MQ</b>	<b>F</b>	<b>Valor p</b>
Curvatura	0,0106	1	0,0106	2,1325	0,2816
(1) Temperatura	0,0272	1	0,0272	5,4919	0,1438
(2) Relação sólido:líquido	0,0344	1	0,0344	6,9337	0,1190
(3) Conc. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,0290	1	0,0290	5,8475	0,1368
1 x 2	0,0233	1	0,0233	4,6996	0,1625
1 x 3	0,0019	1	0,0019	0,3856	0,5980
2 x 3	0,0078	1	0,0078	1,5833	0,3353
<b>Erro</b>	0,0099	2	0,0050		
<b>Total SS</b>	0,2683	9			

\* Significativos ao nível de 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ )

$R^2 = 0,9630$

Apesar de nenhum fator ter sido significativo, a superfície foi gerada em relação à temperatura e a concentração de ácido. Através da superfície de resposta é possível verificar que conforme a temperatura e a concentração de ácido aumentam a concentração de ácido acético também aumenta (Figura 9).



**Figura 9** - Superfície de resposta para a concentração de ácido acético ( $\text{g L}^{-1}$ ) em função da temperatura e concentração de ácido, no hidrolisado de casca de soja obtido em 40 minutos de reação.

A análise de variância referente à concentração de furfural liberado durante a hidrólise da casca de soja em 40 minutos mostrou que apenas a temperatura foi significativa (Tabela 12). A curvatura da equação foi checada e observou-se que para a análise do furfural o modelo linear se enquadra perfeitamente.

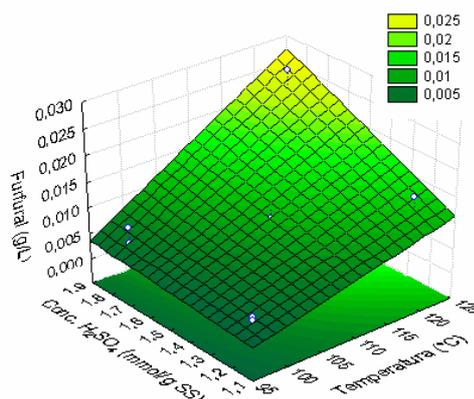
**Tabela 12** - Análise de variância para a concentração de furfural no hidrolisado obtido em 40 minutos de reação.

Fatores	SQ	GDL	MQ	F	Valor p
Curvatura	0,000010	1	0,000010	2,7336	0,2401
(1) Temperatura	0,000177	1	0,000177	46,5497	0,0208*
(2) Relação sólido:líquido	0,000015	1	0,000015	3,8702	0,1880
(3) Conc. $\text{H}_2\text{SO}_4$	0,000046	1	0,000046	12,0319	0,0740
1 x 2	0,000004	1	0,000004	1,0605	0,4113
1 x 3	0,000018	1	0,000018	4,7629	0,1608
2 x 3	0,000001	1	0,000001	0,3279	0,6247
<b>Erro</b>	0,000008	2	0,000004		
<b>Total SS</b>	0,000445	9			

\* Significativos ao nível de 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ )

$R^2 = 0,9830$

A superfície foi gerada em relação à temperatura e a concentração de ácido, fator este que obteve o valor p muito próximo a 0,05, o que mostrou que a geração de furfural aumenta conforme a temperatura e a concentração de ácido aumentam (Figura 10).



**Figura 10** - Superfície de resposta para a concentração de furfural ( $\text{g L}^{-1}$ ) em função da temperatura e concentração de ácido, no hidrolisado de casca de soja obtido em 40 minutos de reação.

Para a concentração de HMF liberada durante a hidrólise da casca de soja, a análise de variância obteve resultados semelhantes aos encontrados para o furfural, sendo apenas a temperatura foi significativa para esta concentração (Tabela 13). A curvatura da equação também foi checada e o modelo linear enquadrou-se perfeitamente para a variável HMF.

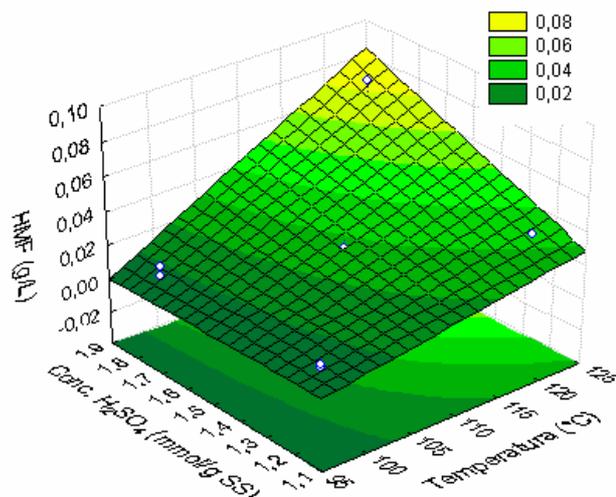
**Tabela 13** - Análise de variância para a concentração de HMF no hidrolisado obtido em 40 minutos de reação.

Fatores	SQ	GDL	MQ	F	Valor p
Curvatura	0,00010	1	0,00010	3,4830	0,2030
(1) Temperatura	0,00186	1	0,00186	61,8598	0,0158*
(2) Relação sólido:líquido	0,00005	1	0,00005	1,5309	0,3415
(3) Conc. $\text{H}_2\text{SO}_4$	0,00037	1	0,00037	12,3608	0,0722
1 x 2	0,00003	1	0,00003	0,9275	0,4371
1 x 3	0,00030	1	0,00030	10,0741	0,0866
2 x 3	0,00002	1	0,00002	0,5585	0,5328
<b>Erro</b>	0,00006	2	0,00003		
<b>Total SS</b>	0,00417	9			

\* Significativos ao nível de 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ )

$R^2 = 0,9856$

A superfície foi gerada em relação à temperatura e a concentração de ácido, outro fator que obteve o valor p muito próximo a 0,05, o que mostrou que a geração de HMF aumenta conforme a temperatura e a concentração de ácido aumentam (Figura 11).



**Figura 11** - Superfície de resposta para a concentração de HMF ( $\text{g L}^{-1}$ ) em função da temperatura e concentração de ácido, no hidrolisado de casca de soja obtido em 40 minutos de reação.

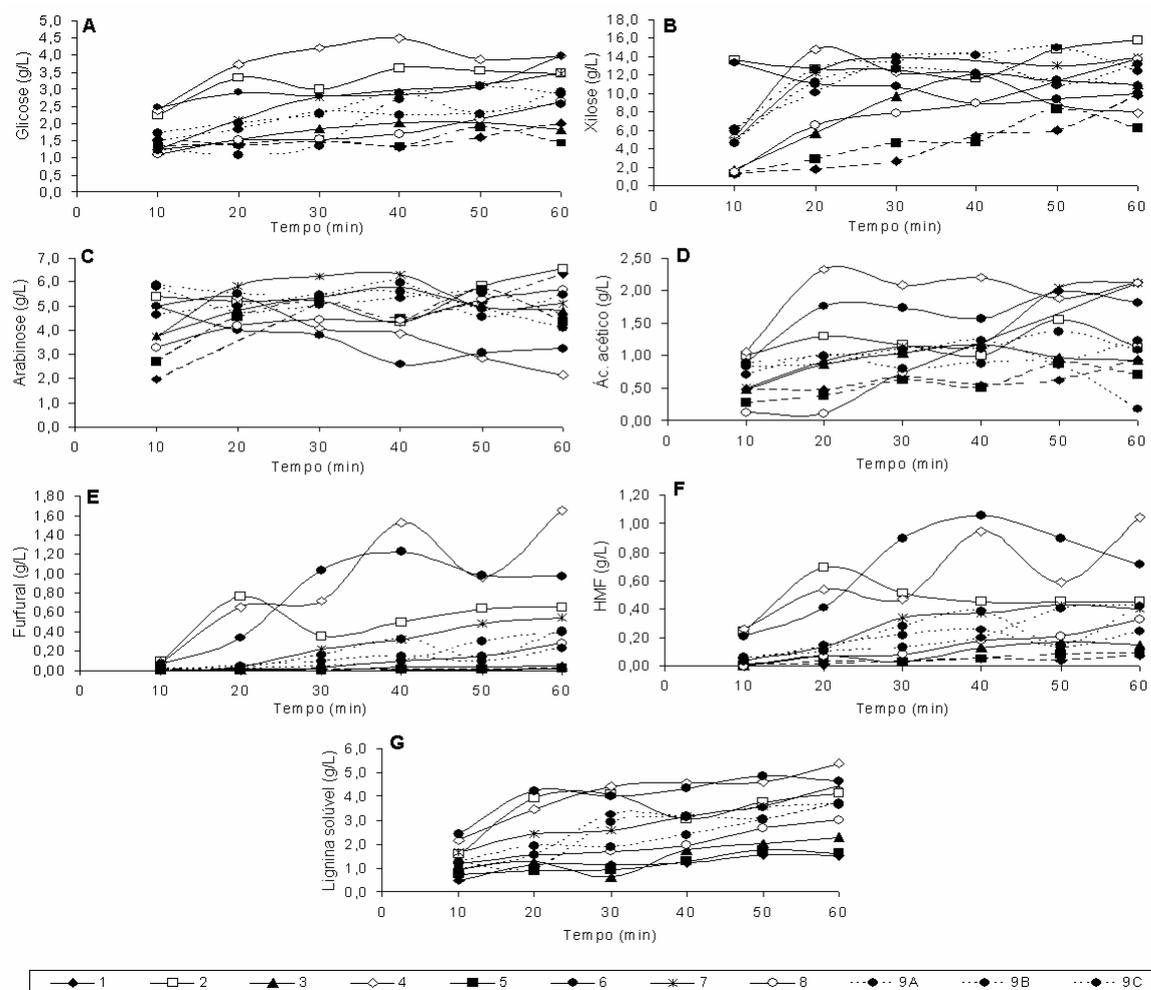
Baseando-se nos resultados obtidos nas cinéticas e nas análises estatísticas da hidrólise da casca de soja, foi possível constatar que a relação sólido-líquido não exerceu influência na maioria das variáveis. Além disso, as concentrações de xilose e arabinose demonstraram valores significativos para a curvatura da equação, dessa forma, o modelo linear testado neste planejamento não foi ideal, fazendo necessária a avaliação dos fatores significativos utilizando o modelo quadrático que possui pontos axiais na sua composição. Conforme as cinéticas obtidas, também foi possível verificar que as concentrações dos açúcares não atingiram valores ótimos e mostraram tendência em continuar aumentando. Já as concentrações dos furaldeídos e do ácido acético mantiveram-se abaixo do valor descrito pela literatura como inibidores de processos fermentativos, isto demonstra que provavelmente um aumento no tempo de hidrólise seria necessário para melhorar o rendimento na eficiência de hidrólise da celulose e hemicelulose.

#### **4.2.2. Otimização das condições de hidrólise da casca de soja**

Conforme os resultados obtidos no primeiro planejamento experimental para a otimização da hidrólise ácida diluída da casca da soja, um segundo planejamento foi realizado, mantendo a relação sólido-líquido constante em 1:10, variando apenas a temperatura e a concentração de ácido sulfúrico por 60 minutos de reação. A faixa de variação para temperatura foi de 110 °C – 160 °C, para concentração de ácido sulfúrico foi entre 1,5 – 3 mmol g<sup>-1</sup> SS e a cinética foi acompanhada a cada 10 minutos ao longo de 60 minutos. Foi realizado um planejamento composto central 2<sup>2</sup>, com três repetições no ponto central a fim de identificar os fatores que influenciavam nas concentrações finais dos açúcares (glicose, xilose e arabinose), furaldeídos (furfural e HMF), ácido acético e lignina.

##### ***4.2.2.1 Cinéticas de Reação***

Considerando-se as cinéticas de reação de até 60 minutos, mostradas na Figura 12, pode-se analisar que as condições de temperatura e concentração de ácido empregadas influenciaram de forma diferente na liberação de cada componente da estrutura lignocelulósica da casca de soja.



**Figura 12** - Cinéticas de liberação de: (A) glicose; (B) xilose; (C) arabinose; (D) ácido acético; (E) furfural, (F) HMF e (G) lignina solúvel, a partir de hidrólise ácida diluída de casca de soja durante 60 minutos. Tratamentos (temperatura, °C; relação sólido-líquido, g g<sup>-1</sup>; concentração de ácido, mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> SS): **1** (●) 118 °C; 1,7 mmol g<sup>-1</sup> SS, **2** (□) 153 °C; 1,7 mmol g<sup>-1</sup> SS, **3** (▲) 118 °C; 2,8 mmol g<sup>-1</sup> SS, **4** (◇) 153 °C; 2,8 mmol g<sup>-1</sup> SS, **5** (■) 110 °C; 2,2 mmol g<sup>-1</sup> SS, **6** (●) 160 °C; 2,2 mmol g<sup>-1</sup> SS, **7** (\*) 135 °C; 3 mmol g<sup>-1</sup> SS, **8** (○) 135 °C; 1,5 mmol g<sup>-1</sup> SS, **9** ponto central (●) 135 °C; 2,2 mmol g<sup>-1</sup> SS.

Para a liberação de glicose (Figura 12-A) pode-se verificar que os tratamentos 4 (153 °C e 2,8 mmol de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> SS) e 6 (160 °C e 2,2 mmol de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> SS) mostraram-se mais eficientes (10,2% e 9% de eficiência de hidrólise, respectivamente). Todavia as concentrações de furfural (Figura 12-E) e lignina solúvel (Figura 12-G) encontradas foram superiores a 1 g L<sup>-1</sup> e 4 g L<sup>-1</sup>, respectivamente, valores acima do nível considerado atóxico para os microrganismos (PALMQVIST E HAHN-HÄGERDAL, 2000b; VILLA et al., 1998). As cinéticas dos tratamentos 4 e 6 foram diferentes, o tratamento 4 obteve seu máximo de

liberação de glicose aos 40 minutos ( $4,5 \text{ g L}^{-1}$ ), a partir desse ponto a concentração de glicose diminuiu e a de HMF aumentou (Figura 12-F). Já o tratamento 6 atingiu o ponto máximo de liberação de glicose ( $4 \text{ g L}^{-1}$ ) em 60 minutos, neste mesmo tempo de reação a concentração de lignina solúvel atingiu  $4,6 \text{ g L}^{-1}$ . A concentração de HMF aumentou ao longo do tempo de reação, atingindo o máximo de  $1 \text{ g L}^{-1}$  aos 40 minutos, em seguida houve um decréscimo na concentração de HMF, provavelmente devido ao fato da degradação do HMF em ácido fórmico e levulínico (GALBE E ZACCHI, 2007).

Quanto à liberação de xilose (Figura 12-B), o tratamento 2 ( $153 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $1,8 \text{ mmol de H}_2\text{SO}_4 \text{ g}^{-1} \text{ SS}$ ) liberou a maior concentração de xilose no tempo de 60 minutos ( $15,8 \text{ g L}^{-1}$  e  $71,1\%$  de eficiência de hidrólise), sendo que as concentrações dos inibidores fermentativos, como furfural, HMF e ácido acético, permaneceram abaixo dos limites tóxicos aos microrganismos. Entretanto a concentração de lignina solúvel foi em torno de  $4 \text{ g L}^{-1}$ , concentração esta que, segundo Parajó (1998), já é considerada tóxica para *Candida guilliermondii*, por exemplo. O tratamento 4 ( $153 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $2,8 \text{ mmol de H}_2\text{SO}_4 \text{ g}^{-1} \text{ SS}$ ) também se mostrou eficiente ( $67,1\%$  de eficiência de hidrólise), liberando  $14,8 \text{ g L}^{-1}$  de xilose em 20 minutos de reação. Neste tempo, a concentração de furfural foi de  $0,6 \text{ g L}^{-1}$  e de lignina solúvel de  $3,5 \text{ g L}^{-1}$ . Quando comparados ambos os tratamentos, pode-se observar que os valores da eficiência de hidrólise foram próximos, no entanto o tempo de reação do tratamento 4 foi 3 vezes menor que o apresentado pelo tratamento 2. Considerando que este processo poderá ser utilizado em escala industrial a diminuição do tempo de reação pode implicar na redução de custos operacionais.

Expressivas quantidades de arabinose foram liberadas já nos primeiros 10 minutos de reação quando se compara as eficiências de hidrólise desta aos demais açúcares avaliados (Figura 12-C). Kabel et al., (2002) observaram que durante a hidrólise, a arabinose foi removida mais facilmente que a xilose da hemicelulose. Os tratamentos 2 ( $153 \text{ }^\circ\text{C}$  e  $1,8 \text{ mmol}$

de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $\text{g}^{-1}$  SS) e 7 (135 °C e 3 mmol de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $\text{g}^{-1}$  SS) foram os mais eficientes na liberação da arabinose (97% e 93% de eficiência de hidrólise, respectivamente), sendo que as concentrações obtidas foram de 6,5  $\text{g L}^{-1}$  e 6,3  $\text{g L}^{-1}$  em 60 minutos e 40 minutos de reação, respectivamente. Para liberação de arabinose, o tratamento 7 poderá ser mais viável para indústria, já que emprega menor temperatura e tempo de reação com rendimento semelhante ao obtido no tratamento 2.

Apesar de algumas condições de hidrólise serem consideradas severas, a concentração de ácido acético não ultrapassou o valor de 3  $\text{g L}^{-1}$  em nenhum tratamento testado, valor este considerado tóxico para muitos microrganismos. Porém, pelo gráfico podemos inferir que condições que empreguem maiores temperaturas e concentrações de ácido que as utilizadas neste trabalho podem ocasionar o aumento na concentração do mesmo, prejudicando o desempenho das fermentações. Para o furfural e HMF é possível verificar que temperaturas acima de 150 °C e concentrações de ácido superiores a 2 mmol de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $\text{g}^{-1}$  SS podem ocasionar a formação desses inibidores em níveis não recomendados para o crescimento microbiano. A lignina solúvel foi o produto de degradação formado em maior quantidade nos hidrolisados, em todas as condições observou-se o aumento da concentração de lignina com o aumento do tempo, nas condições mais severas esse aumento chegou a 5  $\text{g L}^{-1}$ , concentração considerada extremamente tóxica para microrganismos (VILLA et al., 1998).

Considerando apenas a máxima recuperação da soma dos açúcares (glicose, xilose e arabinose), o tratamento 2 (153 °C e 1,8 mmol de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $\text{g}^{-1}$  SS) aos 60 minutos de reação foi o mais eficiente entre todos os avaliados. Todavia, neste tratamento houve uma excessiva liberação de compostos tóxicos que possivelmente causariam inibição do crescimento celular em posteriores processos de bioconversão deste hidrolisado. Para que esse hidrolisado possa ser utilizado em processos biotecnológicos uma etapa de destoxificação se tornaria imprescindível. Todavia, preconizando a aplicação da hidrólise ácida diluída em escala

industrial, um processo que evite o passo de destoxificação é desejável para reduzir custos e a complexidade do método (von SIVERS et al, 1994). Sendo assim, uma alternativa interessante seria empregar um processo de hidrólise ácida diluída, cujo hidrolisado apresente a combinação da maior concentração de açúcares com a mínima concentração inibitória dos compostos tóxicos.

Com base nos resultados das cinéticas, observou-se que, de uma maneira geral, as concentrações dos componentes da casca de soja tendiam a aumentar até os 40 minutos de hidrólise, a partir deste tempo as concentrações permaneciam estáveis ou diminuía. Além disso, baseando-se nos pontos centrais observa-se uma maior estabilidade entre os resultados obtidos até o tempo de 40 min. Alguns casos em que se verificou aumento de concentração após este tempo não demonstraram ser aumentos expressivos. Desta forma, decidiu-se por usar nas análises estatísticas apenas os dados obtidos nesse tempo.

#### ***4.2.2.2. Análises Estatísticas***

Pela metodologia de planejamento de experimentos, foram quantificados os efeitos principais e de interações entre os dois fatores que influenciaram as concentrações dos açúcares (glicose, xilose e arabinose), os furaldeídos (furfural e HMF) e o ácido acético. A curvatura das equações foi checada em todos os casos e a falta de ajuste não foi significativa em nenhum deles, o que revela que o modelo quadrático foi adequado para o modelo proposto para explicar os resultados.

As Tabelas 14, 15, 16, 17, 18, 19 e 20 apresentam as análises de variância (ANOVA) utilizadas para verificar o nível de significância estatística dos efeitos determinados sobre as variáveis independentes. As Figuras 13, 14, 15, 16, 17, 18 e 19 mostram as superfícies de resposta geradas a partir da análise de variância para cada variável independente.

Com relação à análise estatística realizada sobre a concentração de glicose liberada durante a hidrólise da casca de soja em 40 minutos, apenas a temperatura mostrou-se significativa ( $p < 0,05$ ) (tabela 14).

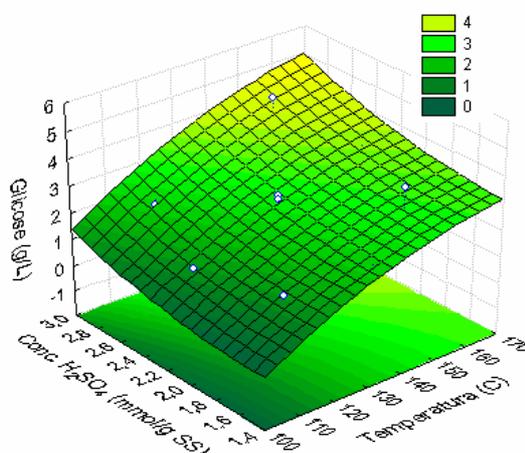
**Tabela 14** - Análise de variância para a concentração de glicose no hidrolisado obtido em 40 minutos de reação.

Fatores	SQ	GDL	MQ	F	Valor p
(1) Temperatura (L)	5,3233	1	5,3233	12,529	0,0240*
Temperatura (Q)	0,1123	1	0,1123	0,2643	0,6343
(2) Conc. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (L)	1,3149	1	1,3149	3,0948	0,1533
Conc. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Q)	0,1073	1	0,1073	0,2526	0,6416
1 (L) x 2 (L)	1,0059	1	0,0059	0,0141	0,9113
<b>Erro</b>	<b>1,6995</b>	<b>4</b>	<b>0,4249</b>		
Falta de Ajuste	1,4768	2	0,7384	6,6309	0,1310
Erro Puro	0,2227	2	0,1113		
<b>Total</b>	<b>9,1354</b>	<b>9</b>			

\* Significativos ao nível de 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ )

$R^2 = 0,8140$

Através da superfície de resposta (Figura 13) foi possível verificar que conforme a temperatura e a concentração de ácido aumentam, a concentração de glicose também aumenta, porém não foi encontrado nenhum ponto crítico, ou seja, nenhuma temperatura ótima de trabalho.



**Figura 13** - Superfície de resposta para a concentração de glicose ( $\text{g L}^{-1}$ ) no hidrolisado de casca de soja obtido em 40 minutos de reação.

A análise de variância (Tabela 15) para concentração de xilose mostrou influência significativa da temperatura e da concentração de ácido, bem como suas interações. Apenas a concentração de ácido quadrática não foi significativa sobre a concentração de xilose a um nível de significância de 95%.

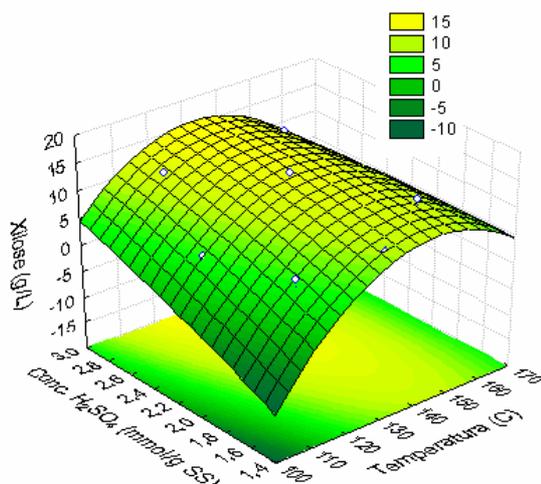
**Tabela 15** - Análise de variância para a concentração de xilose no hidrolisado obtido em 40 minutos de reação.

<b>Fatores</b>	<b>SQ</b>	<b>GDL</b>	<b>MQ</b>	<b>F</b>	<b>Valor p</b>
(1) Temperatura (L)	24,6692	1	24,6692	21,2116	0,0099*
Temperatura (Q)	52,9831	1	52,9831	45,5569	0,0025*
(2) Conc. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (L)	27,9755	1	27,9755	24,0544	0,0080*
Conc. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Q)	0,6894	1	0,6894	0,5928	0,4843
1 (L) x 2 (L)	9,0096	1	9,0096	7,7468	0,0496*
<b>Erro</b>	<b>4,6520</b>	<b>4</b>	<b>1,1630</b>		
Falta de Ajuste	1,8590	2	0,9295	0,6656	0,6004
Erro Puro	2,7931	2	1,3965		
<b>Total</b>	<b>100,1017</b>	<b>9</b>			

\* Significativos ao nível de 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ )

$R^2 = 0,9535$

Nesta análise foi possível verificar que na temperatura de 125 °C ocorre à máxima liberação de xilose existente na casca de soja (Figura 14). Para a concentração do ácido, não foi possível encontrar ponto máximo de liberação de xilose, contudo o ácido exerce influência positiva na liberação da xilose, ainda que de forma reduzida comparada a temperatura. Em trabalho realizado por Mussatto e Roberto (2004), a análise da concentração de ácido e da relação sólido-líquido sobre a xilose foi estudada, a concentração de ácido, assim como neste trabalho, foi significativa positivamente para liberação de xilose, enquanto que a relação sólido-líquido foi significativa negativamente. Já, Canilha et al. (2006), testando condições de temperatura e concentração de ácido (120-140 °C e 100-200 mg g<sup>-1</sup>) para recuperação de xilose em palha de trigo, também obteve o resultado de que ambas variáveis foram significativas para liberação de xilose, sendo que o tratamento de 140 °C e 200 mg g<sup>-1</sup> de ácido foi a melhor.



**Figura 14** - Superfície de resposta gerada para a concentração de xilose ( $\text{g L}^{-1}$ ) no hidrolisado de casca de soja obtido em 40 minutos de reação.

Assim como na liberação da xilose, os fatores que influenciam significativamente a liberação de arabinose no meio foram a temperatura e a concentração de ácido, bem como suas interações (Tabela 16). Apenas a concentração de ácido quadrática não foi significativa sobre a concentração de arabinose a um nível de significância de 95%.

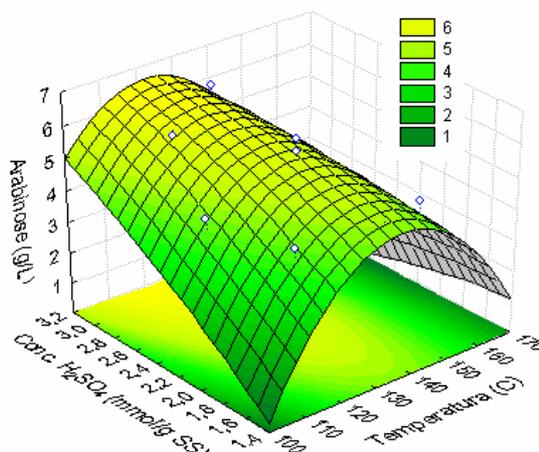
**Tabela 16** - Análise de variância para a concentração de arabinose no hidrolisado obtido em 40 minutos de reação.

Fatores	SQ	GDL	MQ	F	Valor p
(1) Temperatura (L)	2,6153	1	2,6153	19,4161	0,00698*
Temperatura (Q)	5,6860	1	5,6860	42,2141	0,00129*
(2) Conc. $\text{H}_2\text{SO}_4$ (L)	1,6657	1	1,6657	12,3663	0,01698*
Conc. $\text{H}_2\text{SO}_4$ (Q)	0,0650	1	0,0650	0,4824	0,51826
1 (L) x 2 (L)	0,9092	1	0,9092	6,7502	0,04836*
<b>Erro</b>	<b>0,6735</b>	<b>5</b>	<b>0,1347</b>		
Falta de Ajuste	1,8590	3	0,1563	1,5271	0,41922
Erro Puro	2,7931	2	0,1023		
<b>Total</b>	<b>11,7684</b>	<b>10</b>			

\* Significativos ao nível de 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ )

$R^2 = 0,9428$

Com relação à liberação da arabinose foi possível verificar através da superfície de resposta (Figura 15) que existem valores ótimos entre 125 e 135 °C para liberação da mesma nesta faixa de ácido testada (1,5 – 3  $\text{mmol g}^{-1}$  SS).



**Figura 15** - Superfície de resposta para a concentração de arabinose ( $\text{g L}^{-1}$ ) no hidrolisado de casca de soja obtido em 40 minutos de reação.

Segundo a análise de variância (Tabela 17) realizada para hidrólise de ácido acético, os fatores significativos a 95% de significância foram a temperatura e a concentração de ácido, as interações não se mostraram significativas para liberação de ácido acético.

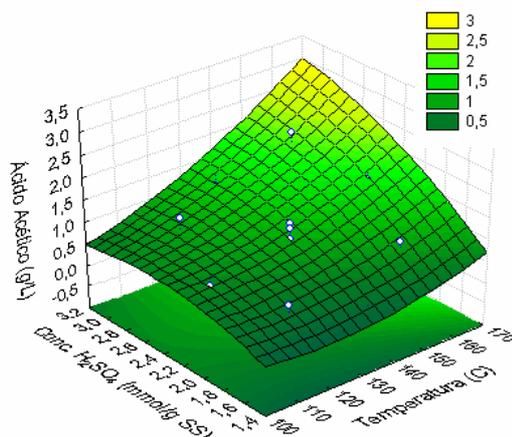
**Tabela 17** - Análise de variância para a concentração de ácido acético no hidrolisado obtido em 40 minutos de reação.

Fatores	SQ	GDL	MQ	F	Valor p
(1) Temperatura (L)	1,1384	1	1,1384	14,9132	0,0119*
Temperatura (Q)	0,0337	1	0,0337	0,4415	0,5358
(2) Conc. $\text{H}_2\text{SO}_4$ (L)	1,3990	1	1,3990	18,3268	0,0079*
Conc. $\text{H}_2\text{SO}_4$ (Q)	0,0777	1	0,0777	1,0179	0,3593
1 (L) x 2 (L)	0,0825	1	0,0825	1,0806	0,3462
<b>Erro</b>	0,3817	5	0,0763		
Falta de Ajuste	0,3185	3	0,1061	3,3583	0,2379
Erro Puro	0,0632	2	0,0316		
<b>Total</b>	3,1566	10			

\* Significativos ao nível de 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ )

$R^2 = 0,8791$

Para esta faixa de temperatura e concentração de ácido testada não foi possível verificar valores de máximo ou mínimo, apenas a indicação de que conforme a temperatura e a concentração de ácido sulfúrico aumentam a concentração de ácido acético também aumenta (Figura 16).



**Figura 16** - Superfície de resposta para a concentração de ácido acético ( $\text{g L}^{-1}$ ) no hidrolisado de casca de soja obtido em 40 minutos de reação.

Com relação à análise de variância sobre a concentração de furfural gerado nos hidrolisados, com exceção da interação quadrática da concentração de ácido sulfúrico, todos os fatores e interações foram significativos a um nível de significância de 95% (Tabela 18).

**Tabela 18** - Análise de variância para a concentração de furfural no hidrolisado obtido em 40 minutos de reação.

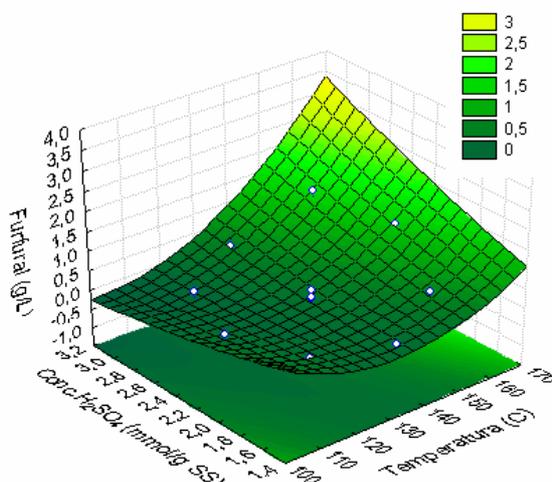
Fatores	SQ	GDL	MQ	F	Valor p
(1) Temperatura (L)	1,7155	1	1,7155	68,6135	0,0004*
Temperatura (Q)	0,3314	1	0,3314	13,2541	0,0149*
(2) Conc. $\text{H}_2\text{SO}_4$ (L)	0,2323	1	0,2323	9,2928	0,0285*
Conc. $\text{H}_2\text{SO}_4$ (Q)	0,0085	1	0,0085	0,3407	0,5848
1 (L) x 2 (L)	0,2490	1	0,2490	9,9588	0,0252*
<b>Erro</b>	0,1250	5	0,0250		
Falta de Ajuste	0,0976	3	0,0325	2,3695	0,3106
Erro Puro	0,0274	2	0,0137		
<b>Total</b>	2,6597	10			

\* Significativos ao nível de 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ )

$R^2 = 0,953$

Neste caso, observou-se a existência de pontos de mínima geração de furfural, ou seja, conseguiu-se otimizar tanto a temperatura quanto a concentração de ácido empregada para minimizar a concentração de furfural no hidrolisado. Para temperatura o valor ótimo foi de 130,3 °C e para concentração de ácido chegou-se ao valor de 1,54 mmol  $\text{g}^{-1}$  SS. Para valores

acima do ponto crítico, a concentração de furfural aumenta de forma mais pronunciada, como é possível observar na superfície (Figura 17).



**Figura 17** - Superfície de resposta para a concentração de furfural ( $\text{g L}^{-1}$ ) no hidrolisado de casca de soja obtido em 40 minutos de reação.

Segundo a ANOVA (Tabela 19), a temperatura linear e quadrática e a concentração de ácido sulfúrico linear influenciaram significativamente a liberação de HMF no meio a um nível de 95% de significância.

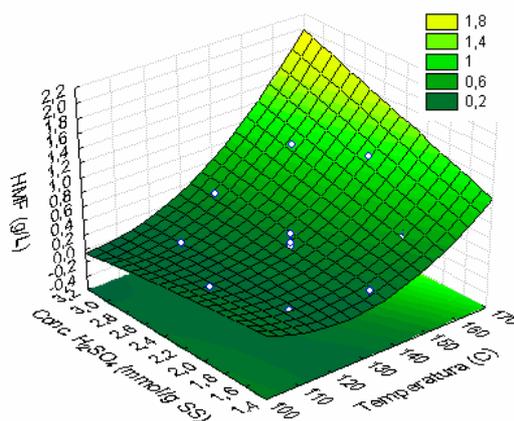
**Tabela 19** - Análise de variância para a concentração de HMF no hidrolisado obtido em 40 minutos de reação.

Fatores	SQ	GDL	MQ	F	Valor p
(1) Temperatura (L)	0,8698	1	0,8698	119,2111	0,0001*
Temperatura (Q)	0,0993	1	0,0993	13,6090	0,0142*
(2) Conc. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (L)	0,0893	1	0,0893	12,2409	0,0173*
Conc. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Q)	0,0002	1	0,0002	0,0281	0,8734
1 (L) x 2 (L)	0,0428	1	0,0428	5,8598	0,0601
<b>Erro</b>	0,0365	5	0,0073		
Falta de Ajuste	0,0182	3	0,0061	0,6637	0,6476
Erro Puro	0,0183	2	0,0091		
<b>Total</b>	1,1501	10			

\* Significativos ao nível de 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ )

$R^2 = 0,9683$

Novamente foram encontrados valores de mínima geração tanto para a temperatura, quanto para a concentração de ácido sulfúrico. São estes 116 °C e 2 mmol g<sup>-1</sup> SS, respectivamente. Na superfície (Figura 18) é possível observar que na temperatura ótima para menor geração de HMF a concentração de ácido praticamente não influencia a liberação de HMF, todavia, acima da mesma, a concentração de HMF tende a aumentar expressivamente.



**Figura 18** - Superfície de resposta para a concentração de HMF (g L<sup>-1</sup>) no hidrolisado de casca de soja obtido em 40 minutos de reação.

Para a liberação de lignina solúvel, temperatura (linear) e ácido (linear) foram significativas positivas a um nível de 95% de significância (tabela 20).

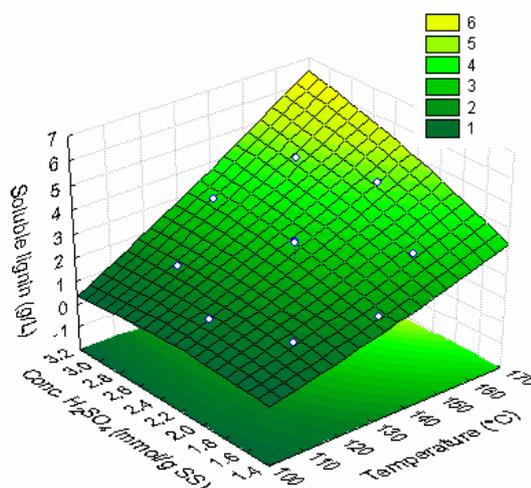
**Tabela 20** - Análise de variância para a concentração de lignina solúvel no hidrolisado obtido em 40 minutos de reação.

Fatores	SQ	GDL	MQ	F	Valor p
(1) Temperatura (L)	9,8818	1	9,8818	45,8835	0,0011*
Temperatura (Q)	0,0096	1	0,0096	0,0444	0,8415
(2) Conc. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (L)	1,7688	1	1,7688	8,2131	0,0352*
Conc. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Q)	0,0508	1	0,0509	0,2361	0,6476
1 (L) x 2 (L)	0,2318	1	0,2318	1,0765	0,3470
<b>Erro</b>	1.0768	5	0,2154		
Falta de Ajuste	0.0303	3	0.0101	0.0193	0.9953
Erro Puro	1.0466	2	0.5233		
<b>Total</b>	13.0397	10			

\* Significativos ao nível de 5% de probabilidade ( $p \leq 0,05$ )

$R^2 = 0,9174$

Para esta faixa de temperatura e concentração de ácido testada não foi possível verificar valores de máximo ou mínimo, apenas a indicação de que conforme a temperatura e a concentração de ácido sulfúrico aumentam a concentração de lignina solúvel também aumenta (Figura 19). Mussatto e Roberto (2006) constataram que a concentração de ácido foi significativamente negativa para liberação de lignina solúvel por resíduo de bagaço de malte. Todavia, as condições de hidrólise aplicadas neste estudo são mais severas e o teor de lignina presente na casca de soja é menor do que no bagaço de malte.



**Figura 19** - Superfície de resposta para a concentração de lignina solúvel ( $\text{g L}^{-1}$ ) no hidrolisado de casca de soja obtido em 40 minutos de reação.

Com objetivo de obter um tratamento que possua a maior concentração de açúcares possível, mantendo as concentrações dos inibidores da fermentação em níveis abaixo dos descritos como tóxicos pela literatura (PALMQVIST E HAHN-HÄGERDAL, 2000; DELGENES et al., 1996; FELIPE et al. 1995; PARAJO et al., 1998), foi elaborada uma função objetivo. Concentrações de glicose, xilose, arabinose, ácido acético, furfural, HMF e lignina solúvel foram expressas pelas equações geradas por regressão linear múltipla sobre os dados obtidos no planejamento experimental e são mostradas na Tabela 21.

**Tabela 21** - Equações para cada composto usado para elaboração da função objetiva.

Equação	R <sup>2</sup>
$Glu = 2.496346 + 0.850189 X - 0.145149 X^2 + 0.589961 Y + 0.248470 Y^2 + 0.046682 X Y$	0.8140
$Xyl = 13.07084 + 1.83022 X - 3.15268 X^2 + 2.72122 Y - 0.62974 Y^2 - 1.81228 X Y$	0.9535
$Ara = 5.62683 - 0.57180 X - 1.00374 X^2 + 0.45616 Y - 0.10717 Y^2 - 0.47677 X Y$	0.9428
$HAc = 1.075497 + 0.377258 X + 0.077277 X^2 + 0.418054 Y - 0.117190 Y^2 + 0.143604 X Y$	0.8791
$Fur = 0.183857 + 0.463100 X + 0.242313 X^2 + 0.170365 Y + 0.038800 Y^2 + 0.249494 X Y$	0.9530
$HMF = 0.278116 + 0.329747 X + 0.132638 X^2 + 0.105625 Y - 0.006021 Y^2 + 0.103383 X Y$	0.9683
$SL = 2.726789 + 1.111483 X + 0.041150 X^2 + 0.470072 Y - 0.094802 Y^2 + 0.240750 X Y$	0.9174

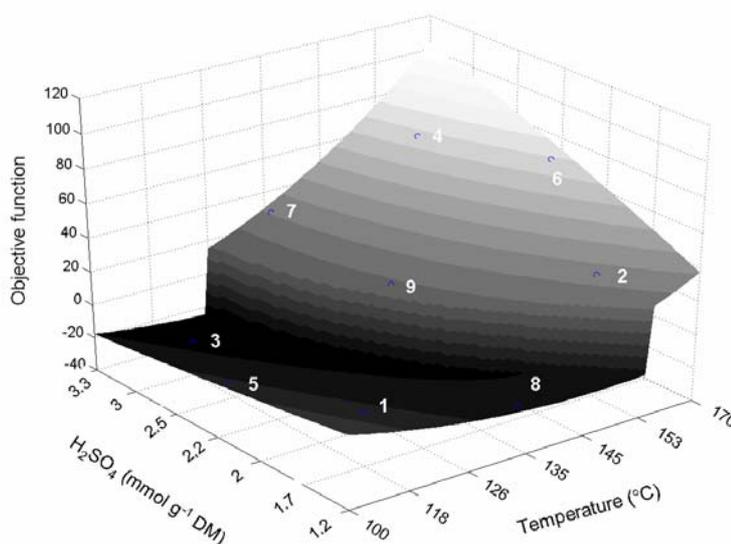
$X$  = temperatura;  $Y$  = concentração de ácido;  $Glu$  = glicose;  $Xyl$  = xilose;  $Ara$  = arabinose;  $HAc$  = ácido acético;  $Fur$  = furfural;  $HMF$  = hidrometilfurfural;  $SL$  = lignina solúvel.

Essa função ( $F_{obj}$ ) foi proposta levando em consideração o efeito sinérgico que os compostos tóxicos podem ter sobre o metabolismo microbiano durante o processo de fermentação. Zaldivar et al. (2000) propôs que a toxicidade dos hidrolisados lignocelulósicos resulta da agregação de vários compostos tóxicos (álcoois, aldeídos e ácidos), e não destes compostos individualmente. Dessa forma, é difícil estabelecer a concentração máxima de cada inibidor que pode ser tolerado pelos microrganismos, pois a inibição depende fortemente da série de fatores como a fisiologia do microrganismo, sua adaptação ao meio, o tipo de processo fermentativo, entre outros (Mussatto e Roberto, 2004). Para simular um tratamento ideal para a hidrólise diluída da casca de soja, um limite de 4 g L<sup>-1</sup> foi estipulado para a soma total dos inibidores da concentração (furfural, HMF, ácido acético). Pesos diferentes ( $w$ ) foram designados aos compostos tóxicos na função objetivo (Equação 5). Quando a soma dos compostos tóxicos,  $tox$  (Equação 6) excede a concentração de 4 g L<sup>-1</sup> ( $tox > 4$ ), a função peso é aumentada em 10 vezes para  $tox$  ( $w = 10$ ), caso contrário, a prioridade é dada à soma da concentração de açúcares e, neste caso,  $w = 0,1$ .

$$F_{obj} = w \cdot tox - (Glu + Xyl + Ara) \quad (\text{Eq. 10})$$

$$tox = HMF + Fur + HAc + SL \quad (\text{Eq. 11})$$

A Figura 20 representa o resultado da função objetivo para a hidrólise ácida diluída da casca de soja. O tratamento com a máxima liberação de açúcares, mantendo a concentração da soma de furfural, HMF, ácido acético e lignina solúvel abaixo de  $4 \text{ g L}^{-1}$  foi o que utilizou temperatura de  $118 \text{ }^\circ\text{C}$  e concentração de ácido de  $2,8 \text{ mmol H}_2\text{SO}_4 \text{ g}^{-1} \text{ SS}$  em 40 minutos (Ponto 3 na Figura. 20).



**Figura 20** - Superfície de resposta gerada pela função objetiva. Pontos representam tratamentos sob diferentes temperaturas e concentração de ácido.

A eficiência deste tratamento foi de 5%, 55% e 86% para a glicose, xilose e arabinose. O tratamento de hidrólise sugerido pela função objetivo foi menos eficiente para liberação dos açúcares comparado ao tratamento de máxima solubilização dos mesmos obtidos no estudo cinético ( $153 \text{ }^\circ\text{C}$ ;  $1,8 \text{ mmol H}_2\text{SO}_4 \text{ g}^{-1} \text{ SS}$ ) em 60 minutos, com eficiência de liberação de glicose, xilose e arabinose de 8%, 72% e 97%, respectivamente, mas também gerando cerca de  $10 \text{ g L}^{-1}$  total de tóxicos.

O melhor tratamento para a liberação dos açúcares rendeu cerca de 87% de eficiência total de hidrólise em 60 minutos, enquanto que a função objetivo gerada para prever o melhor

tratamento de hidrólise, a fim de minimizar a formação de substâncias tóxicas mostrou 59% de eficiência em 40 minutos. Embora a liberação máxima de açúcares tenha sido maior em 28% que o previsto pela função objetiva, o tempo foi reduzido em 33% neste último tratamento, este fato pode tornar o processo mais viável economicamente. Além disso, o tratamento sugerido pela função objetiva gerou baixas concentrações de substâncias tóxicas, eliminando a necessidade de medidas de destoxificação para o bioprocessamento.

O processo de hidrólise ácida diluída solubiliza principalmente a hemicelulose, expondo a estrutura de celulose ao ataque de enzimas. Dessa forma, o baixo grau de hidrólise da celulose atingido no tratamento otimizado sugerido pela função objetivo não é um problema, uma vez que a hidrólise ácida diluída combinada com hidrólise enzimática tem sido considerada um procedimento promissor para a produção de etanol lignocelulósico, por exemplo (HENDRICKS E ZEEMAN, 2009).

### **4.3. AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE XILITOL E ETANOL POR MICRORGANISMOS**

#### **4.3.1. Ensaio em frascos agitados**

Atualmente, diversas pesquisas apontam que a viabilidade econômica do processo de produção de bioetanol depende de uma maior conversão dos açúcares (pentoses e hexoses) existentes nos hidrolisados de materiais lignocelulósicos. Além disso, atualmente se busca alcançar o processo de biorrefinaria, que consiste na recuperação de diversos produtos de alto valor agregado oriundos da conversão dos materiais lignocelulósicos, como a obtenção simultânea de xilitol e etanol a partir das pentoses e hexoses provenientes do hidrolisado de um resíduo agroindustrial (LATIF E RAJOKA, 2001). Sendo assim, a utilização de

consórcios de microrganismos que fermentem tanto as hexoses (glicose, manose e galactose), quanto as pentoses (xilose e arabinose) a etanol e/ou xilitol é bastante desejável (MARGEOT et al., 2009; FU et al., 2009). As leveduras conhecidas como maiores produtoras de xilitol pertencem ao gênero *Candida* (WINKELHAUSEN AND KUZMANOVA, 1998), no entanto as *Candidas* também possuem capacidade de produzir etanol como reportado por Schirmer-Michel et al. (2007). Em experimento realizado com *Candida guilliermondii* sobre hidrolisado de casca de soja, Schirmer-Michel et al. (2007), relatou a produção de etanol de aproximadamente 6 g L<sup>-1</sup> após 24 horas de cultivo em agitador orbital. Atualmente a levedura *Saccharomyces cerevisiae* é considerada a principal levedura utilizada para fermentar hexoses a etanol, sendo que outro microrganismo bastante estudado para este fim é a bactéria *Zymomonas mobilis* (MERICCO et al., 2007; SAHA, 1997).

Com o intuito de avaliar a capacidade de conversão dos açúcares fermentescíveis por consórcios microbianos selecionados conforme a capacidade da cepa e/ou gênero produzir xilitol e/ou etanol já descrito na literatura, ensaios utilizando meio semi-sintético composto de xilose, glicose e arabinose foram realizados em agitador orbital. Os consórcios foram constituídos por combinações de cepas capazes de converter hexoses e pentoses, pertencentes à coleção do Bioteclab, e estes estão descritos na Tabela 22.

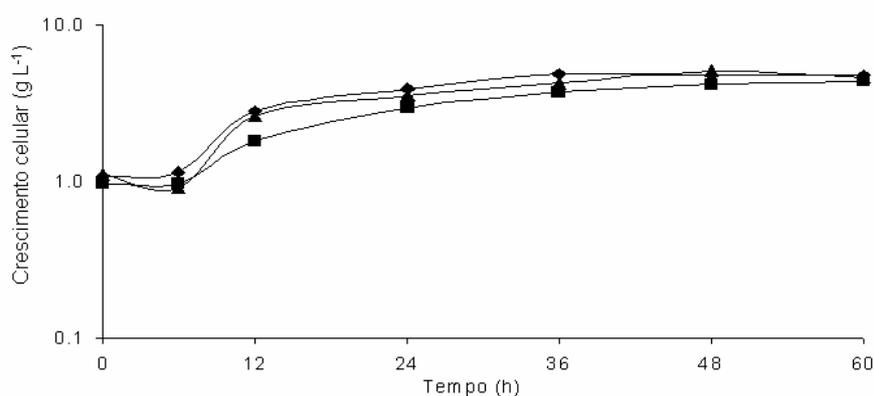
**Tabela 22** - Composição de cepas dos consórcios avaliados sobre meio semi-sintético em frascos agitados.

CONSÓRCIO 1	CONSÓRCIO 2	CONSÓRCIO 3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Zymomonas mobilis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>Candida tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Zymomonas mobilis</i>
<i>Candida utilis</i>	<i>Candida utilis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
<i>Candida kefyri</i>	<i>Candida kefyri</i>	<i>Candida utilis</i>
<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Candida kefyri</i>
<i>Candida silvicola</i>	<i>Candida silvicola</i>	<i>Candida guilliermondii</i>
		<i>Candida silvicola</i>

As concentrações dos componentes do meio de cultura simularam a composição de açúcares fermentescíveis de hidrolisados hemicelulósicos provenientes de processos de hidrólise ácida diluída sem a adição de inibidores do processo fermentativo comum nos hidrolisados. A produção de xilitol e etanol pelos consórcios microbianos foi avaliada através da determinação da concentração destes produtos no meio, durante 60 horas de fermentação.

#### 4.3.1.1. Avaliação do crescimento celular dos consórcios

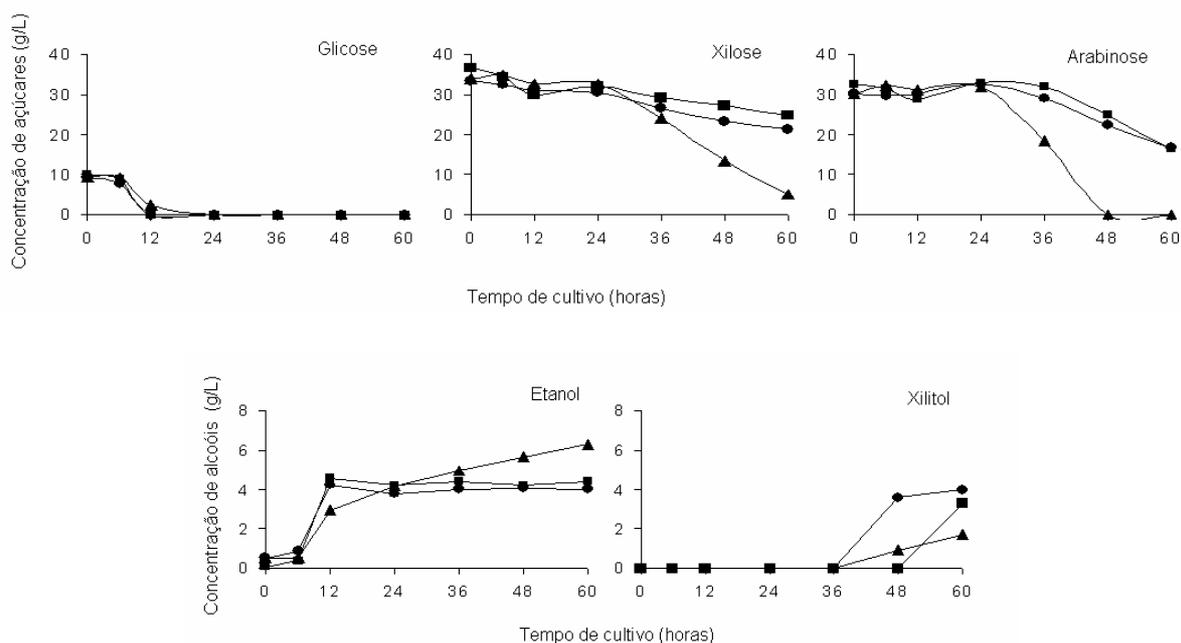
O crescimento celular dos consórcios (Figura 21) foi avaliado com base no peso seco. A partir das 6 horas de cultivo, pode-se observar o início da fase exponencial para os três cultivos, sendo que o cultivo 2 demonstrou um crescimento mais lento, com valores menores de concentração celular durante todo o cultivo, quando comparado aos outros consórcios. O máximo crescimento obtido para esse consórcio foi de  $4,3 \text{ g L}^{-1}$  ao final do cultivo. O consórcio 1 obteve o máximo crescimento em 36 horas de cultivo ( $4,8 \text{ g L}^{-1}$ ). Já o consórcio 3 atingiu  $5 \text{ g L}^{-1}$  em 48 horas de cultivo.



**Figura 21** - Concentração celular ( $\text{g L}^{-1}$ ): Consórcio 1 (◆); Consórcio 2 (■) e Consórcio 3 (▲). Resultados são a média de dois experimentos.

#### 4.3.1.2. Avaliação do consumo dos açúcares e produção de etanol e xilitol

A Figura 22 mostra o perfil do consumo dos açúcares, bem como a produção de etanol e xilitol pelos consórcios avaliados. A glicose foi totalmente consumida nas primeiras 18 horas de cultivo e os três consórcios avaliados demonstraram um perfil semelhante. O consórcio 2 mostrou-se mais eficiente quanto ao consumo da xilose e arabinose, metabolizando 85% e 100% destes açúcares, respectivamente, enquanto que os consórcios 1 e 3 consumiram 33% e 36% de xilose e 50% e 45% de arabinose, respectivamente. O consórcio 2 consumiu 93% dos açúcares presentes no meio de cultura após 60 h de cultivo, já os consórcios 1 e 3 consumiram cerca de 50% dos açúcares, neste mesmo tempo.



**Figura 22** - Comparação do consumo de glicose, xilose e arabinose e produção de etanol e xilitol ( $\text{g L}^{-1}$ ) pelos consórcios 1(■); 2(▲) e 3(●) em meio semi-sintético. Resultados são a média de dois experimentos.

Dentre os consórcios avaliados quanto à produção de etanol, o consórcio 2 foi o que produziu a maior concentração deste,  $6,3 \text{ g L}^{-1}$ , considerando-se os valores de produtividade volumétrica ( $Q_P$ ), como pode ser observado na Tabela 23. Todavia, o fator de conversão

( $Y_{P/S}$ ) do consórcio 2 foi inferior ao encontrado para os demais consórcios, já que a produção de etanol deste foi mais lenta e crescente, fato este que pode ser verificado na cinética de produção (Figura 22). As maiores concentrações de etanol para os consórcios 1 e 3 foram obtidas nas primeiras 12 horas de cultivo, permanecendo constantes ao longo do cultivo. Na Figura 22 é possível verificar que mesmo após a glicose ser totalmente consumida a produção de etanol do consórcio 2 foi crescente, esse aumento na concentração durante o cultivo provavelmente se deve a conversão de uma certa parcela das pentoses pelas leveduras do gênero *Candida*, uma vez que *Zymomonas mobilis* não possui aparato enzimático para metabolizar pentoses (SAHA, 1997). Esse fato pode ser corroborado pela análise do fator de conversão teórico de glicose a etanol (0,51) (SALVI et al. 2009), que demonstra que a concentração de etanol obtida foi maior ( $6,3 \text{ g L}^{-1}$ ) do que o valor esperado ( $4,7 \text{ g L}^{-1}$ ) com base na concentração inicial de glicose do cultivo ( $9,3 \text{ g L}^{-1}$ ), ou seja, no mínimo aproximadamente  $1,6 \text{ g L}^{-1}$  de etanol foi produto da conversão das pentoses (85% xilose e 100% arabinose foram consumidas) contida no meio de cultura. Hahn-Hagerdal et al (2007) afirmam que várias espécies de leveduras possuem capacidade de fermentar arabinose a etanol, sendo que meios de cultura que contêm extrato de levedura e peptona, cuja composição possui compostos que podem agir como aceptores de elétrons, auxiliam na conversão de arabinose a etanol.

A produção de etanol por leveduras do gênero *Candida* foi descrita em diversos estudos, como o reportado por Ordaz et al. (2001) onde *Candida utilis* produziu etanol ( $1,6 \text{ mg L}^{-1}$ ) sobre altas concentrações de glicose ( $100 \text{ g L}^{-1}$ ), em fermentação contínua quando altas densidades celulares foram utilizadas. Rattanachomsri et al. (2009) avaliaram a produção de etanol e outros compostos derivados de biomassa vegetal por *C. tropicalis* em experimento realizado sobre polpa de mandioca. *C. tropicalis* produziu  $14,3 \text{ g L}^{-1}$  de etanol com taxa de produtividade de  $0,48 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ , após 30 horas de fermentação.

**Tabela 23** - Resultados obtidos para produção de etanol e xilitol em frascos agitados.

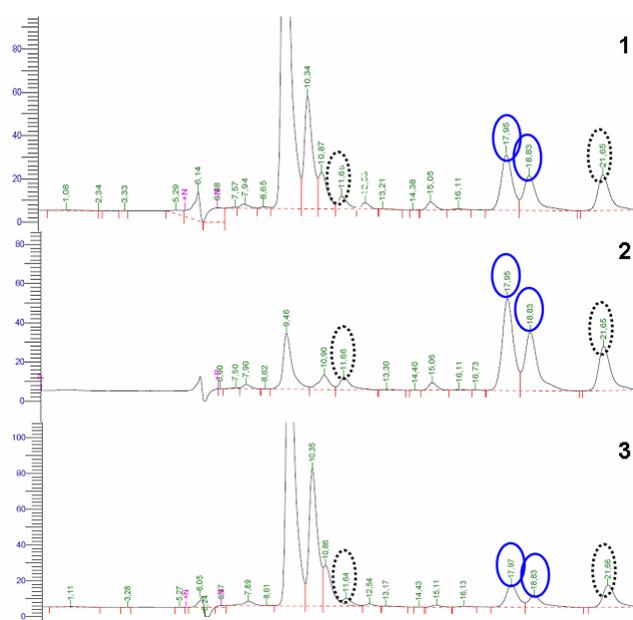
Consórcio	Etanol	$Y_{P/S}$ (g g <sup>-1</sup> )	$Q_P$ (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	Xilitol	$Y_{P/S}$ (g g <sup>-1</sup> )	$Q_P$ (g.L <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )
1	4,4	0,11	0,07	3,3	0,09	0,05
2	6,3	0,08	0,10	1,7	0,03	0,03
3	4,0	0,10	0,06	4,0	0,11	0,07

Os consórcios apresentaram perfis diferentes para a produção de xilitol chegando a 4 g.L<sup>-1</sup> e 3,3 g.L<sup>-1</sup> para os consórcios 3 e 1, respectivamente. A produção deste álcool foi detectada apenas nas últimas 24 horas de cultivo. Segundo Du Preez (1994) este fato pode ser explicado pela menor taxa de utilização da xilose (4 vezes menor) frente à glicose durante a produção de etanol, isso resulta de uma repressão catabólica que a glicose exerce na indução da enzima aldose-redutase (SUGAI E DELGENES, 1995).

Como pode ser observado na Tabela 23, tanto os fatores de conversão, quanto às produtividades volumétricas, foram considerados baixos quando comparados com outros trabalhos reportados na literatura. Latif e Rajoka (2001) utilizaram *Candida tropicalis* e *S. cerevisiae* isoladas e em co-cultura sobre hidrolisado de sabugo de milho, visando à obtenção de xilitol e etanol. Estes autores obtiveram resultados superiores para produção de etanol e xilitol, quando utilizadas concentrações semelhantes de açúcares às empregadas neste trabalho, em seus cultivos. Os valores de  $Y_{P/S}$  (g g<sup>-1</sup>) e  $Q_P$  (g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) para produção de etanol a partir do consórcio foram de 0,26 e 0,15, respectivamente. Esses valores foram inferiores aos encontrados para cada microrganismo isoladamente. Para a produção de xilitol do consórcio os valores foram de 0,59 e 0,14 para  $Y_{P/S}$  (g g<sup>-1</sup>) e  $Q_P$  (g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>), respectivamente. Quando avaliado cada microrganismo isoladamente, resultados superiores de  $Y_{P/S}$  (g g<sup>-1</sup>) e  $Q_P$  (g.L<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>) foram encontrados, mostrando que o consórcio proporcionou melhores resultados para a produção de xilitol. Latifa e Rajoka observaram que a produção de xilitol exibiu uma fase lag

de 24 horas, enquanto que nos cultivos realizados neste trabalho a produção de xilitol foi detectada apenas após 36 horas de cultivo.

Durante o cultivo dos três consórcios foram detectados através da análise cromatográfica produtos secundários de fermentação. Observando o cromatograma, na figura 23, é possível verificar a produção de compostos secundários que ainda não foram identificados, através do aparecimento de picos nos tempos de retenção de 17,9 e 18,8 minutos. O consórcio 2 foi o que apresentou maior consumo de açúcares e ao mesmo tempo a maior formação destes subprodutos, levando a crer que a rota metabólica de formação do etanol e principalmente do xilitol foi desviada para formação destes compostos secundários.



**Figura 23** - Cromatogramas de amostras obtidas do cultivo dos consórcios 1, 2 e 3 em meio de cultivo semi-sintético às 60 horas de cultivo. Círculos com linha cheia indicam a presença de compostos não identificados, círculos com linha aberta indicam a presença de xilitol e etanol.

Com base no esquema simplificado do metabolismo de xilose e arabinose integrado com a via glicolítica até a produção de etanol em fungos (Adaptado de STAMBUCK et al., 2008), apresentado no item 2.2 da revisão bibliográfica, é possível especular sobre os possíveis subprodutos provenientes do metabolismo das leveduras sobre o meio semi-

sintético (composto de glicose, xilose e arabinose) utilizado neste trabalho. Algumas espécies como *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* além de produzirem altas taxas de xilitol oriundas da xilose, e de transformarem as hexoses presentes na hemicelulose em etanol, também acumulam arabitol, produto de conversão da arabinose presente no meio (BARBOSA et al., 1988; NOLLEAU et al., 1993; MEYRIAL et al., 1991). O consumo de arabinose evidenciado principalmente no cultivo com o consórcio 2 coincide com a maior formação dos subprodutos não identificados (em área). Este fato provavelmente indica que um dos compostos possivelmente seja arabitol, produto de conversão de arabinose pelas leveduras do gênero *Candida* presentes nos consórcios. Pesquisa realizada por Delgenes et al. (1998), utilizou para produção de xilitol meio semi-sintético composto por xilose, glicose e arabinose, co-cultura de *Lactobacillus reuterii* e *Candida guilliermondii*. Neste trabalho houve a formação de subprodutos como o arabitol, o qual foi produzido por *C. guilliermondii*, fato este que reforça a hipótese de que os cultivos realizados neste trabalho podem ter produzido arabitol.

Sob condições aeróbicas muitas leveduras tem potencial para produzir álcoois polihídricos como xilitol, glicerol e D-arabitol a partir de D-xilose. Outros produtos finais resultantes do catabolismo de D-xilose são ácido acético, cítrico e xilônico (SINGH E MISHA, 1995). Sendo assim, mais estudos analíticos seriam necessários para identificar corretamente os subprodutos da fermentação dos consórcios.

### 4.3.2. Ensaio em Biorreatores de cultivo submerso

#### 4.3.2.1. Hidrolisado Hemicelulósico de casca de soja

O meio de fermentação utilizado nos biorreatores de cultivo submerso foi o hidrolisado de casca de soja, oriundo do processo de hidrólise ácida diluída, que empregou a temperatura de 122 °C, relação sólido-líquido de 1: 8,8 g g<sup>-1</sup> SS e concentração de ácido sulfúrico de 1,8 mmol de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> por grama de sólido seco. Em seguida, este meio foi concentrado 4 vezes a fim de aumentar o teor de açúcares fermentescíveis e o pH foi corrigido para o valor ideal de crescimento dos microrganismos. Nenhum método de destoxificação foi aplicado. Após a correção do pH os meios foram suplementados. A composição do meio original e concentrado 4 vezes (média da composição dos biorreatores) está descrita na Tabela 24.

**Tabela 24** - Composição (g L<sup>-1</sup>) do hidrolisado de casca de soja original e concentrado 4 vezes.

Hidrolisado	Glicose	Xilose	Arabinose	Ác. acético	Furfural	HMF	Lignina Solúvel
Original	1,5	6,3	4,5	0,6	0,03	0,08	0,29
Concentrado 4 vezes	6	25,2	18	1	0,02	0,2	0,47

Comparando-se os hidrolisados observa-se que o teor dos açúcares presentes no hidrolisado original aumentaram de maneira proporcional ao fator de concentração utilizado. A quantidade de ácido acético presente no hidrolisado concentrado não sofreu um aumento diretamente proporcional ao fator de concentração (4 vezes) como o esperado, e este fato provavelmente se deve a volatilização parcial deste composto. Segundo Canilha (2006), o

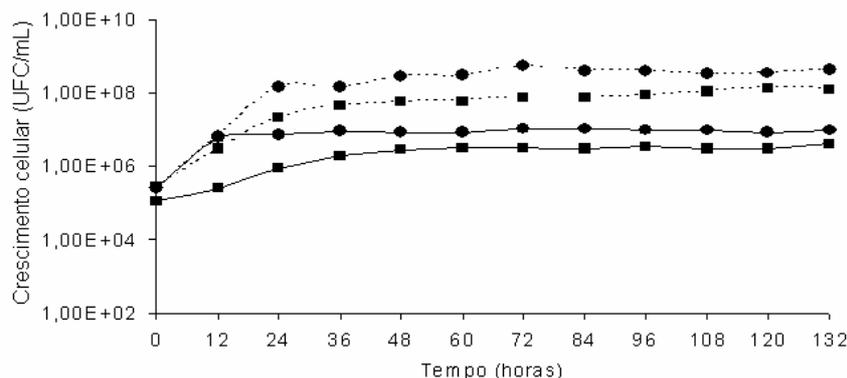
baixo valor do pH do hidrolisado (menor que 1,0) favorece a volatilização parcial do ácido acético, por esse se encontrar em sua forma não dissociada neste tratamento.

A concentração do furfural no hidrolisado concentrado foi menor, o que indica que ocorreu uma remoção deste composto, possivelmente favorecida pela temperatura de concentração do hidrolisado (70 °C), já que segundo Perry (1997) furfural apresenta ponto de ebulição de 54-55 °C. Para HMF e lignina total, verificaram-se aumentos progressivos nas quantidades desses compostos após a concentração do hidrolisado.

#### ***4.3.2.2. Ensaios em biorreatores de cultivo submerso utilizando consórcios de microrganismos***

Os microrganismos *Z. mobilis*, *C. tropicalis* e *C. guilliermondii* foram avaliados em consórcio sobre hidrolisado de casca de soja com o pH corrigido para 5,5. Estes experimentos foram conduzidos sob condições anaeróbias e microaerófilas (1 vvm; 300 rpm) para avaliação da produção de etanol e xilitol por este consórcio. Testes em meio semi-sintético foram realizados simulando a composição do hidrolisado de casca de soja concentrado para efeitos de comparação da cinética de crescimento, perfil do consumo de substrato e produtos obtidos.

A Figura 24 mostra o crescimento deste consórcio sob hidrolisado de casca de soja e meio semi-sintético sob condições anaeróbias e microaerófilas.

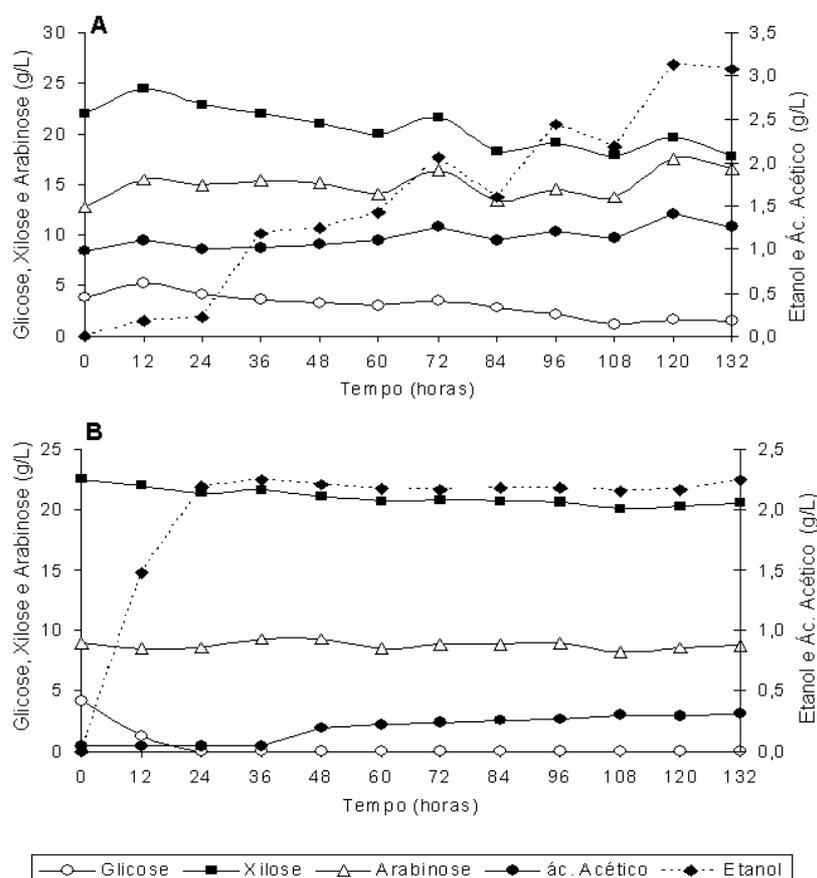


**Figura 24** - Crescimento celular do consórcio composto por *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii* e *Zymomonas mobilis* em hidrolisado de casca de soja (■) e meio semi-sintético (●) sob condições anaeróbias (linha cheia) e microaerófilas (linha vazada). Resultados são a média de dois experimentos.

Verifica-se que o crescimento celular dos experimentos realizados sob condições microaerófilas mostrou-se maior que os cultivados em anaerobiose e que em hidrolisado o crescimento foi menor do que o encontrado para o meio semi-sintético mostrando a influência do meio no crescimento celular. Em 72 horas de cultivo sob condições de microaerofilia, o crescimento em meio semi-sintético atingiu  $5,45 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>, já o maior crescimento no cultivo feito sobre o hidrolisado foi de  $1,38 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> em 120 horas de cultivo. Em anaerobiose, a concentração celular máxima em meio semi-sintético foi de  $1 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup> em 72 horas de cultivo enquanto que sobre hidrolisado foi de  $3,9 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> após 132 horas de cultivo, crescimento mais lento e menor se comparado ao meio semi-sintético. Como o hidrolisado estudado apresenta baixas concentrações de tóxicos, a diferença no crescimento celular pode estar relacionada à elevada pressão osmótica do mesmo. A pressão osmótica do hidrolisado ( $2149 \text{ mOsm.Kg}^{-1}$ ) é em torno de 7 vezes maior do que a determinada para o meio semi-sintético ( $316 \text{ mOsm.Kg}^{-1}$ ). De acordo com Liu et al. (2006), a pressão osmótica de  $2108 \text{ mOsm.Kg}^{-1}$  foi suficiente para inibir o crescimento de leveduras, inclusive para espécies osmofílicas como *Candida krusei*. Neste trabalho, as leveduras *C. tropicalis*, *C. guilliermondii* e a bactéria *Z. mobilis* cresceram e mantiveram o

crescimento constante no hidrolisado com elevada pressão osmótica, o que sugere a osmotolerância desses microrganismos. *Candida guilliermondii* já foi reportada por Schirmer-Michel et al. (2008) como sendo osmotolerante em cultivo feito sobre hidrolisado de casca de soja concentrado 4 vezes, a pressão osmótica do hidrolisado ( $2948 \text{ mOsm Kg}^{-1}$ ) era 11 vezes maior do que a encontrada para o meio semi-sintético ( $263 \text{ mOsm Kg}^{-1}$ ) e a levedura conseguiu crescer um pouco mostrando viabilidade ( $>95\%$ ). *Z. mobilis* é considerada um microrganismo osmotolerante, porém o crescimento nessas soluções é geralmente lento (SINGH E MISHA, 1995).

A produção de álcoois bem como o consumo dos açúcares do consórcio em hidrolisado de casca de soja e em meio semi-sintético sob condições anaeróbias está representado pela Figura 25.

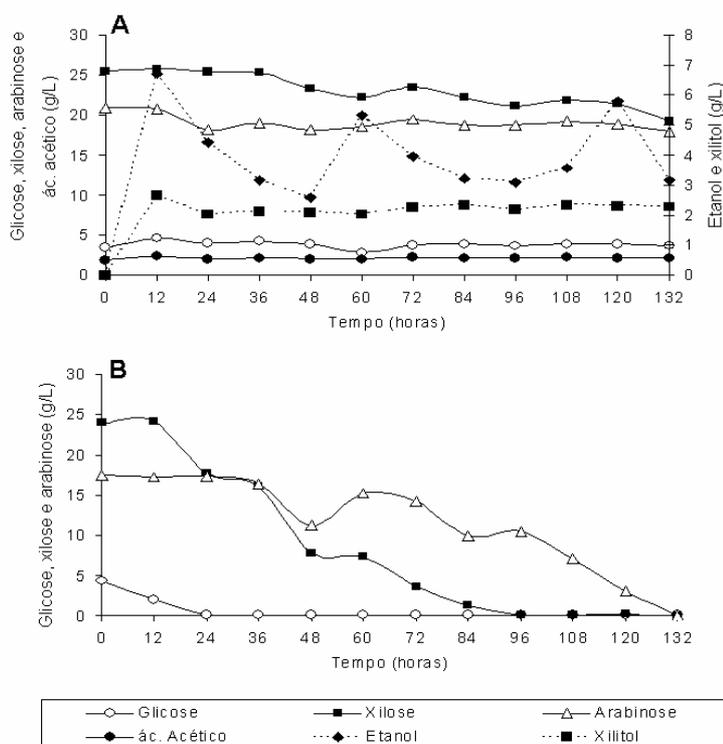


**Figura 25** - Cultivo do consórcio composto por *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii* e *Zymomonas mobilis* sobre hidrolisado de casca de soja (A) e meio semi-sintético (B) sob condições anaeróbias.

Nos cultivos anaeróbicos realizado sobre hidrolisado de casca de soja (Figura 25-A) pode-se observar que 20,8% dos açúcares fermentescíveis foram consumidos ao longo de 132 horas de cultivo, restando 28,8%, 72,2% e 100% de glicose, xilose e arabinose, respectivamente. Em meio semi-sintético (Figura 25-B) a glicose foi totalmente exaurida nas primeiras 24 horas de cultivo, enquanto que o consumo de xilose e arabinose permaneceu abaixo de 10% para cada açúcar. O consumo total dos açúcares no meio semi-sintético foi de apenas 18,2%. Segundo Skoog and Hahn-Hägerdal (1988), a produção de etanol a partir de pentoses por leveduras está estritamente ligada à presença de oxigênio em baixas concentrações. O crescimento em anaerobiose é raro, sendo *Saccharomyces cerevisiae* uma das poucas leveduras capazes de crescer em completa anaerobiose (VISSER et al., 1990). Dessa forma a baixa assimilação de xilose e não assimilação de arabinose pelas leveduras *C. guilliermondii* e *C. tropicalis* provavelmente está vinculada à condição de anaerobiose do meio. Com relação à produção de etanol, constatou-se a formação do mesmo em ambos cultivos, sendo que o perfil dessa produção foi diferente. No meio semi-sintético a produção atingiu o máximo em 24 e manteve-se estável, a taxa de bioconversão ( $Y_{P/S}$ ) considerando apenas as hexoses foi alta ( $0,54 \text{ g g}^{-1}$ ), assim como a eficiência que atingiu 100%, todavia a produtividade volumétrica foi baixa ( $0,02 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ ). Quando esses valores são calculados para todos os açúcares o  $Y_{P/S}$  é de  $0,35 \text{ g g}^{-1}$  e a eficiência da conversão cai para 68%, esse fato deve-se a incapacidade das leveduras em metabolizar pentoses sob condições anaeróbias. Já no hidrolisado o etanol foi produzido lentamente ao longo das 132 horas de cultivo, neste caso o  $Y_{P/S}$  calculado para todos os açúcares foi de  $0,33 \text{ g g}^{-1}$ , a produtividade foi de  $0,02 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  e a eficiência de conversão foi de 64%, o que revela que a conversão a etanol e o consumo dos açúcares foi semelhante apesar do meio semi-sintético apresentar baixa pressão osmótica e não conter os compostos tóxicos como o hidrolisado. Neste experimento não foi

constatada a produção de xilitol tanto em meio semi-sintético quanto em hidrolisado, isto porque, 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.

A produção de álcoois bem como o consumo dos açúcares do consórcio em hidrolisado de casca de soja e em meio semi-sintético sob condições microaerófilas está representado na Figura 26.



**Figura 26** - Cultivo do consórcio composto por *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii* e *Zymomonas mobilis* em hidrolisado de casca de soja (A) e meio semi-sintético (B) sob condições microaerófilas.

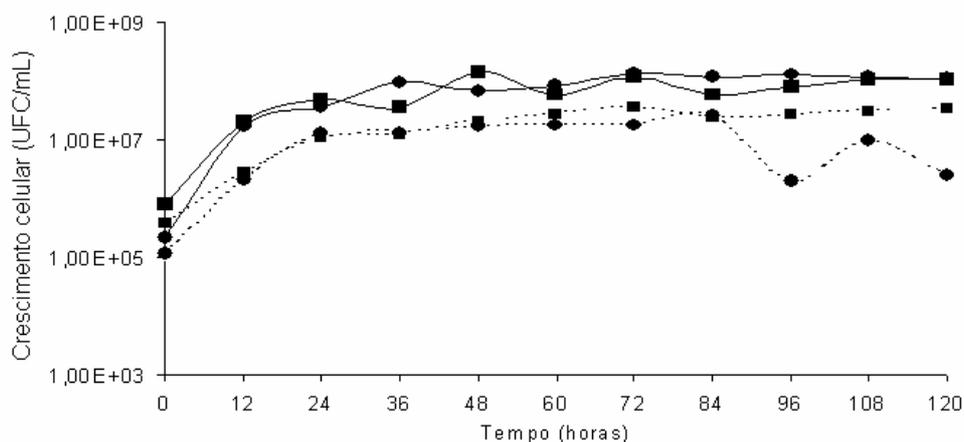
O cultivo do consórcio sob condições microaerófilas (1vvm; 300 rpm) em hidrolisado de casca de soja metabolizou 20%, 25% e 14% de glicose, xilose e arabinose, respectivamente, ao longo do período de incubação (Figura 26-A). Enquanto que apenas 20% dos açúcares presentes no hidrolisado foram consumidos em microaerofilia, em meio semi-

sintético 100% dos açúcares foram exauridos, sendo que a glicose foi prontamente metabolizada em 24 horas de cultivo (Figura 26-B). A fermentação conduzida em microaerofilia sobre hidrolisado apresentou picos de produção de  $7 \text{ g L}^{-1}$ ,  $5,3 \text{ g L}^{-1}$  e  $5,8 \text{ g L}^{-1}$  de etanol em 12, 60 e 120 horas de cultivo, respectivamente. O etanol formado foi consumido pelos microrganismos subsequentemente a sua produção, esse comportamento se repetiu ao longo do cultivo. Ainda neste cultivo foi observada a produção de xilitol que se manteve constante ao longo do cultivo (em torno de  $2 \text{ g L}^{-1}$ ), com taxa de conversão de  $0,04 \text{ g g}^{-1}$ , obtendo uma baixa eficiência (5%). Em estudo realizado com co-cultivo de *Z. mobilis* e *Pachisolen tannophilus* para produção de etanol em meio sintético, contendo glicose ( $60 \text{ g L}^{-1}$ ) e xilose ( $40 \text{ g L}^{-1}$ ), Fu e Peris (2008) obtiveram  $26,25 \text{ g L}^{-1}$  de etanol em 12 h de cultivo, originados do consumo de glicose por *Z. mobilis*, uma vez que *P. tannophilus* foi inoculada após o consumo da glicose. Além disso, a maior produção de etanol por *Z. mobilis* foi relacionada à fase log de crescimento celular. A produção de etanol e xilitol, sob condições microaerófilas, em meio semi-sintético, não foi observada (Figura 25-B). Este fato provavelmente se deve a conversão do total dos açúcares presentes no meio em biomassa, uma vez que este ensaio foi o que atingiu a maior concentração celular ( $5,45 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$ ) em 72 horas de cultivo quando comparado aos demais experimentos. O fato de este ensaio utilizar um consórcio de microrganismos e de haver uma diversidade de condições experimentais empregadas em outros trabalhos torna difícil a comparação destes resultados com dados publicados na literatura.

#### 4.3.2.3. Ensaio em biorreatores de cultivo submerso utilizando *Candida guilliermondii* e *Debaryomyces hansenii*

As leveduras *Candida guilliermondii* e *Debaryomyces hansenii*, descritas pela literatura como excelentes produtoras de xilitol (WINKELHAUSEN E KUZMANOVA, 1998; PARAJÓ et al., 1997), foram avaliadas isoladamente sob hidrolisado de casca de soja concentrado (pH 6). Estes experimentos foram conduzidos sob condições microaerófilas (1 vvm; 300 rpm), com o objetivo de avaliar e comparar a produção de xilitol e etanol entre as leveduras. Ensaio em meio semi-sintético foram realizados simulando a composição do hidrolisado de casca de soja concentrado para analisar os efeitos do hidrolisado sobre a fisiologia das espécies avaliadas.

O crescimento celular (multiplicação celular) das leveduras em meio semi-sintético e em hidrolisado está representado na Figura 27.



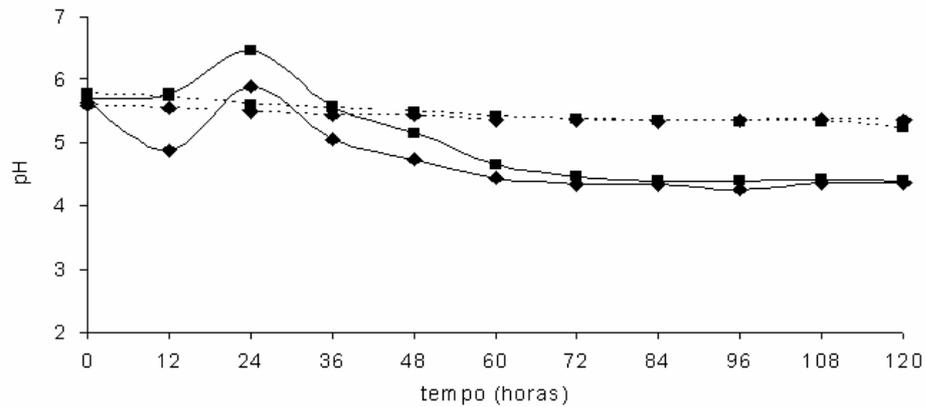
**Figura 27** - Crescimento celular de *C. guilliermondii* (●) e *D. hansenii* (■) sobre hidrolisado de casca de soja (linha vazada) e meio semi-sintético (linha cheia) sob condições microaerófilas.

O crescimento de *D. hansenii* e *C. guilliermondii*, foi um log maior sobre meio semi-sintético do que sobre o hidrolisado. O perfil de crescimento de *D. hansenii* e *C. guilliermondii* para o mesmo meio de cultura foi semelhante, no entanto *C. guilliermondii* a

entrou em fase de declínio após 84 horas de cultivo. Este resultado mostra que a levedura *D. hansenii* adaptou-se melhor ao hidrolisado do que *C. guilliermondii*. Vale lembrar, que os hidrolisados utilizados nestes experimentos sofreram correção de pH com adição de hidróxido de sódio sólido, o que provavelmente ocasiona a formação de sais. Muitos microrganismos têm seu metabolismo prejudicado diante altas concentrações de sais nos meios de cultura. *D. hansenii* apresentou um perfil de crescimento estável até o final do período de cultivo, este comportamento provavelmente se deve a halotolerância descrita para esta espécie por diversos autores. Segundo Neves et al. (1997) o íon sódio não exerce um efeito tóxico específico no crescimento para esta levedura, sendo que suas células são capazes de tolerar quantidades iguais de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  (PRISTA et al., 1997). O cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ) pode exercer efeito positivo no crescimento desta levedura quando condições de estresse estão presentes, como temperatura alta ou baixa, e pH em torno de 7 (ALMAGRO et al., 2000). Por essas características fisiológicas, *D. hansenii* é eventualmente designada como uma levedura halofílica. Gonzalez-Hernandez et al. (2004) sugeriram que o sódio não é retirado desta levedura, mas que os sistemas metabólicos dela devem ser resistentes a altas concentrações intracelulares de sais (ALMAGRO et al., 2001; VELKOVA E SYCHROVA, 2006).

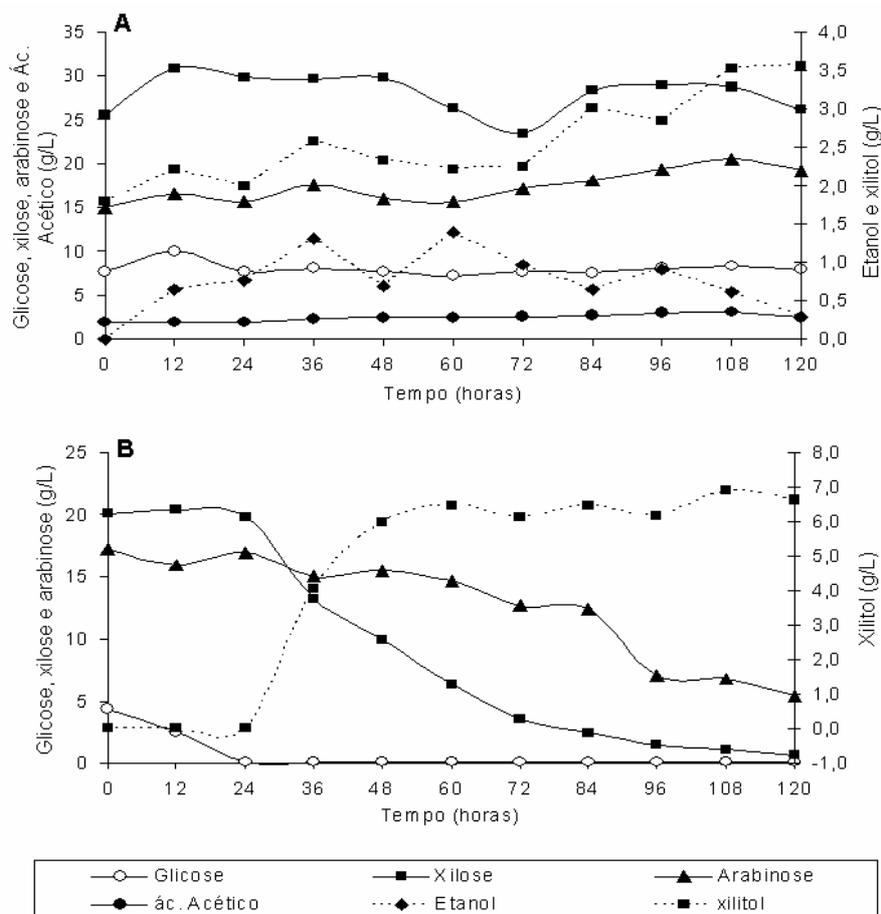
A diminuição do crescimento nas horas finais de cultivo em hidrolisado por *C. guilliermondii* não foi observada por Schirmer-Michel et al. (2009) em hidrolisado de casca de soja sob condições microaerófilas. O que pode ter contribuído para a diminuição do crescimento celular no cultivo sobre o hidrolisado utilizado neste estudo foi a pressão osmótica deste meio ( $2550 \text{ mOsm Kg}^{-1}$ ) que foi superior a encontrada por Schirmer-Michel et al. (2009) no hidrolisado de casca de soja concentrado 2 vezes ( $1584 \text{ mOsm Kg}^{-1}$ ). O hidrolisado em que *D. hansenii* cresceu, também apresentava valor semelhante para pressão osmótica ( $2540 \text{ mOsm Kg}^{-1}$ ) demonstrando assim a osmotolerância desse microrganismo.

Quanto ao pH dos cultivos, tanto o pH do hidrolisado cultivado com *C. guilliermondii* quanto com *D. hansenii* não variou, mantendo-se em torno de 5,5. Em meio sintético o pH diminuiu de 6 para 4,5 em ambos os cultivos (Figura 28).



**Figura 28** - pH dos cultivos de *C. guilliermondii* (◆) e *D. hansenii* (■) sobre hidrolisado de casca de soja (linha vazada) e meio semi-sintético (linha cheia) sob condições microaerófilas.

A produção de álcoois bem como o consumo dos açúcares por *C. guilliermondii* em hidrolisado de casca de soja e em meio semi-sintético sob condições microaerófilas está representado na Figura 29.



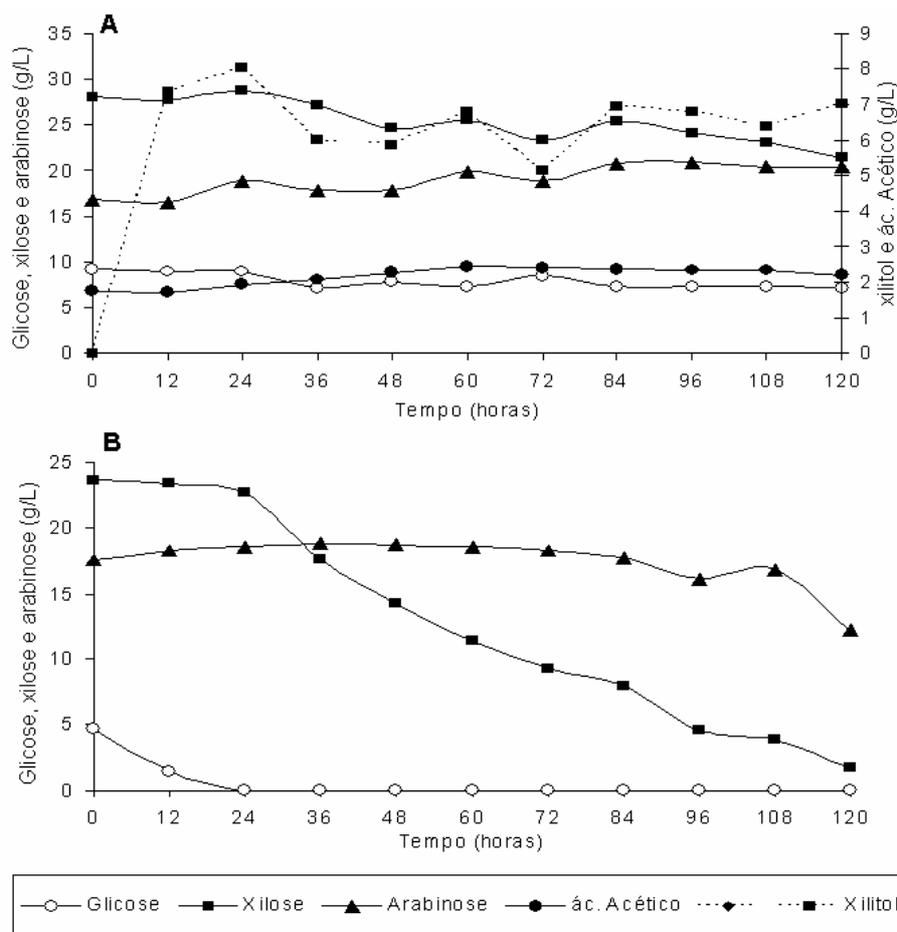
**Figura 29** - Cultivo de *Candida guilliermondii* sobre hidrolisado de casca de soja (A) e meio semi-sintético (B) sob condições microaerófilas.

Na Figura 29-A é possível verificar que 7,3 % dos açúcares fermentescíveis presentes hidrolisado de casca de soja foram consumidos pela levedura *C. guilliermondii* restando apenas 79%, 84,5% e 100% de glicose, xilose e arabinose, respectivamente. A produção de etanol foi inferior a  $2 \text{ g L}^{-1}$ , enquanto que a produção de xilitol atingiu  $3,6 \text{ g L}^{-1}$  em 120 horas de cultivo, com taxas de bioconversão ( $Y_{P/S}$ ) de  $0,42 \text{ g de xilitol/g xilose}$  e 20% de eficiência de conversão. Em trabalho realizado por Schirmer-Michel et al., (2009), *C. guilliermondii* NRRL Y-2075 foi cultivada em microaerofilia, sobre hidrolisado destoxificado de casca de soja concentrado 2 vezes. Durante o cultivo, etanol e xilitol foram produzidos, sendo que a concentração máxima de etanol foi atingida com taxa de conversão superior ( $Y_{P/S} 0,4 \text{ g etanol g}^{-1} \text{ açúcar}$ ) ao encontrado neste trabalho ( $Y_{P/S} 0,3 \text{ g etanol g}^{-1} \text{ açúcar}$ ), todavia a produção de xilitol encontrada por Schirmer-Michel et al., (2009) ( $< 2,5 \text{ g L}^{-1}$ ) foi inferior a encontrada

neste trabalho ( $3,6 \text{ g L}^{-1}$ ), bem como, a taxa de conversão do mesmo que para Schirmer-Michel et al., (2009) foi de  $0,22 \text{ g}$  de xilitol/g xilose. Mussatto et al. (2005) cultivaram *C. guilliermondii* em hidrolisado de bagaço de malte concentrado ( $85 \text{ g L}^{-1}$  de xilose) e obtiveram taxas de bioconversão ( $Y_{P/S}$ ) de  $0,37 \text{ g}$  de xilitol/g xilose e 40% de eficiência de produção. Os valores para  $Y_{P/S}$  e eficiência no hidrolisado de bagaço de malte sem concentrar foram maiores para Mussatto et al. (2005), demonstrando a provável influência da pressão osmótica do meio. Neste cultivo foi detectada produção de etanol, em concentrações inferiores a  $2 \text{ g L}^{-1}$  sendo este consumido lentamente ao longo do cultivo. Segundo Delgenes et al. (1998) o consumo de etanol está relacionado a uma incompleta conversão da xilose. No cultivo sobre meio semi-sintético (figura 29-B) esta levedura consumiu 85,2% dos açúcares, restando apenas 31,5% de arabinose. A produção de xilitol chegou a aproximadamente  $7 \text{ g L}^{-1}$  ao final do cultivo, com  $Y_{P/S}$  de  $0,36 \text{ g}$  de xilitol/g xilose, eficiência de 18% e produtividade volumétrica de  $0,1 \text{ g L}^{-1}\text{h}^{-1}$ . No entanto, neste ensaio não foi detectada a produção de etanol. Para Mussatto et al. (2005), em 100 horas de cultivo a produção de xilitol em meio semi-sintético ( $20 \text{ g L}^{-1}$  de xilose) obteve  $Y_{P/S}$  de  $0,54 \text{ g}$  de xilitol/g xilose, eficiência de 58,9% e produtividade volumétrica de  $0,37 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

Estudos com *C. guilliermondii* mostram que a aeração com  $K_{La}$  de  $20 \text{ h}^{-1}$  é determinante para produção de xilitol. Futuros estudos podem avaliar o  $K_{La}$  e a produção de xilitol pela(s) levedura(s) do Bioteclab, uma vez que 1 vvm neste hidrolisado ou para esta levedura pode não ser a condição ideal.

Os resultados referentes à produção de álcoois e consumo de açúcares no cultivo com *D. hansenii* sobre hidrolisado de casca de soja e meio semi-sintético, em biorreatores submersos sob condições microaerófilas encontram-se a Figura 30.



**Figura 30** - Cultivo de *Debaryomyces hansenii* sobre hidrolisado de casca de soja (A) e meio semi-sintético (B) sob condições microaerófilas.

*D. hansenii* consumiu 16,3% do total de açúcares fermentescíveis no hidrolisado (glicose, xilose e arabinose). Considerando que a arabinose não foi consumida, foram assimiladas especificamente 22,6% e 24% de glicose e xilose, respectivamente (Figura 30-A). Sendo assim, *D. hansenii* ao contrário de *C. guilliermondii*, consumiu mais xilose do que glicose, conseguindo converter boa parte desta xilose a xilitol em apenas 12 horas de cultivo, sendo que em 24 horas a produção de xilitol chegou a  $8 \text{ g L}^{-1}$ , mantendo-se em torno de  $7 \text{ g L}^{-1}$  ao longo do cultivo. A taxa de conversão para xilitol foi de  $1 \text{ g de xilitol/ g de xilose}$ , a produtividade volumétrica foi de  $0,6 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  e a eficiência foi de 50%. Os resultados obtidos neste experimento foram semelhantes aos encontrados por Carvalheiro et al. (2007) em

cultivo feito com *D. hansenii* sobre hidrolisado de bagaço de malte onde o  $Y_{P/S}$  foi de 0,49 g de xilitol/g xilose e a produtividade volumétrica foi de  $0,46 \text{ g L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

No cultivo realizado em meio semi-sintético 100% de glicose, 93% de xilose e 33,3% de arabinose foram consumidas por *D. hansenii*, totalizando 70,2% dos açúcares fermentescíveis presente no meio, no entanto não foi constatada a produção de etanol e xilitol ao longo do período de fermentação (Figura 30-B). O crescimento celular, nesse cultivo foi maior do que o observado (Figura 27), sobre hidrolisado, o que sugere uma provável conversão dos açúcares presentes no meio em biomassa.

Comparando-se o cultivo de *C. guilliermondii* e *D. hansenii* sobre hidrolisado de casca de soja foi possível verificar que *D. hansenii* além de adaptar-se melhor ao meio de cultivo, obteve melhores resultados na produção de xilitol, todavia o processo necessita ser otimizado, uma vez que restou uma grande quantidade de açúcar no meio de cultivo.

A Tabela 25 apresenta a síntese do consumo dos açúcares, produção de etanol e xilitol nas diferentes condições de fermentação avaliadas neste trabalho. Foram conduzidas fermentações em biorreatores submersos sobre meio semi-sintético e hidrolisado de casca de soja concentrado, empregando consórcio de microrganismos (composto por *Z. mobilis*, *C. tropicalis* e *C. guilliermondii*) e as leveduras *C. guilliermondii* e *D. hansenii*, isoladamente. A glicose foi 100% consumida em todos os cultivos realizados sobre meio semi-sintético, já sobre o hidrolisado o maior consumo foi observado na fermentação que empregou o consórcio sob condição anaeróbica. O consumo das pentoses foi maior no cultivo onde foi utilizado o consórcio sobre hidrolisado em anaerobiose, todavia este mesmo consórcio foi o que menos consumiu as pentoses em meio semi-sintético.

**Tabela 25** – Síntese do consumo dos açúcares, da produção de etanol e xilitol pelo consórcio e por *C. guilliermondii* e *D. hansenii*, isoladamente sobre meio sintético e hidrolisado de casca de soja.

Cultivo	Gli (%)	Xil (%)	Ara (%)	Y <sub>P/S</sub> ET (g g <sup>-1</sup> )		ηET (%)		Y <sub>P/S</sub> XIL (g g <sup>-1</sup> )		ηXIL (%)	
				TOT	ESP	TOT	ESP	TOT	ESP	TOT	ESP
Consórcio MS-A	100	9,3	3,3	0,35	0,54	68	100	-	-	-	-
Consórcio MS – MA	100	100	100	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>D. hansenii</i> MS – MA	100	92,8	33,3	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. guilliermondii</i> MS – MA	100	100	68,5	-	-	-	-	0,2	0,4	0	18
Consórcio H – A	71,2	27,8	0	0,33	0,06	64	11	-	-	-	-
Consórcio H – MA	20,0	25,0	14	NC	NC	NC	NC	0,24	0,32	26	35
<i>D. hansenii</i> H – MA	22,6	24,0	0	-	-	-	-	0,8	1	40	50
<i>C. guilliermondii</i> H – MA	21,0	15,5	0	0,30	0,51	60	100	0,42	0,37	21	19

TOT = g de produto g<sup>-1</sup> total açúcares; ESP = g produto g<sup>-1</sup> glicose ou xilose; MS = meio sintético; MS-A = meio sintético em anaerobiose; MS-MA = meio sintético em microaerofilia; H = hidrolisado; H-A = hidrolisado em anaerobiose; H-MA = hidrolisado em microaerofilia; (-) = não produziu; (NC) = não calculado;

As maiores concentrações de etanol foram obtidas nos cultivos que empregaram o consórcio em anaerobiose, tanto sobre meio semi-sintético quanto sobre hidrolisado, e *C. guilliermondii* sobre hidrolisado sob condições microaerófilas. Sugerindo a influência da aeração na conversão dos açúcares a etanol. Dentre todos os microrganismos testados *D. hansenii* foi o único que não produziu etanol em ambos meios de cultivo avaliados. Todavia este foi microrganismo que apresentou maior produção de xilitol sobre hidrolisado em microaerofilia. Reforçando a necessidade de pequenas quantidades de oxigênio para se obter produção de xilitol. As maiores concentrações de xilitol foram obtidas sobre o hidrolisado e apesar do consórcio em anaerobiose ter apresentado as maiores eficiências na produção de etanol, os demais cultivos mostraram maiores produções do mesmo também sobre hidrolisado. Este fato indica provavelmente que o hidrolisado impõe uma condição de estresse fisiológico ao microrganismo que promove a produção de xilitol e etanol

## 5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados nesse trabalho, pode-se concluir que a casca de soja é um substrato com grande potencial para bioprocessos após tratamento com hidrólise ácida diluída. O teor de açúcares deste material corresponde à composição de outros resíduos agroindustriais, enquanto que o seu teor de lignina foi considerado baixo, fato que favorece a aplicação em bioprocessos e facilita o pré-tratamento de hidrólise.

O tratamento de hidrólise (153 °C e 1,8 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> SS) sugerido como melhor condição segundo a cinética proposta pelo planejamento central composto atingiu valores de eficiência altos (87% em 60 minutos), todavia uma grande concentração de tóxicos também foi liberada neste tratamento. Já a condição de hidrólise sugerida pela função objetivo gerada para prever o melhor tratamento de hidrólise e minimizar a formação de substâncias tóxicas (118°C e 2,8 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> SS) obteve menor eficiência (59% em 40 minutos). No entanto, este tratamento pode tornar o processo mais viável economicamente, uma vez que o tempo de reação foi reduzido e uma etapa de destoxificação para o bioprocessos foi eliminada.

Quanto às fermentações pode-se concluir que maiores estudos necessitam ser realizados para otimizar a conversão do hidrolisado de casca de soja a etanol e/ou xilitol por consórcios de microrganismos.

Este trabalho comprovou a impossibilidade das leveduras em assimilar pentoses em anaerobiose.

As maiores concentrações de etanol foram encontradas nas fermentações realizadas utilizando o consórcio (*Z. mobilis*, *C. tropicalis* e *C. guilliermondii*) e *C. guilliermondii*, sobre meio semi-sintético (sob anaerobiose) e sobre hidrolisado (sob microaerofilia), respectivamente.

Com relação à produção de xilitol, o cultivo que empregou *D. hansenii* sobre hidrolisado de casca de soja demonstrou um melhor desempenho da levedura tanto em adaptação ao meio quanto em produção de xilitol, todavia o processo necessita ser otimizado, uma vez que uma grande quantidade de açúcar residual foi detectada no hidrolisado após o término do período de fermentação.

## 6. PERSPECTIVAS

Considerando os investimentos em novas tecnologias para produção de biocombustíveis através de resíduos lignocelulósicos, uma das perspectivas é investir no aproveitamento total do resíduo de casca de soja através da utilização da técnica de hidrólise enzimática em combinação com o processo já desenvolvido neste trabalho de hidrólise ácida diluída. Além disso, a seleção de uma ou duas cepas de microrganismos específicos para conversão dos açúcares presentes no hidrolisado em etanol se faz necessária, juntamente com a avaliação de diferentes condições de aeração, uma vez que a aeração de 1 vvm pode estar muito próxima a uma condição de anaerobiose para estas leveduras nestes meios.

Para que o processo de produção de combustível de segunda geração obtenha um aumento na produtividade dos processos fermentativos, é fundamental o investimento em pesquisas relacionadas aos processos de culturas contínuas com biocatalisadores imobilizados. Tais sistemas, ainda dependem de otimização e poderão ser utilizados com vantagem em comparação aos modelos convencionalmente utilizados nas indústrias, como é o caso do processo em batelada com células livres.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEN, A.; RUTH, M.; IBSEN, K.; JECHURA, J.; NEEVES, K.; SHEEHAN, J. Lignocellulosic biomass to ethanol process design and economics utilizing co-current dilute acid prehydrolysis and enzymatic hydrolysis for corn stover. Technical report, NREL/TP-510-32438. **National Renewable Energy Laboratory**, 2002.

ALMAGRO, A.; PRISTA, C.; CASTRO, S.; QUINTAS, C.; MADEIRA-LOPES, A.; RAMOS, J.; LOUREIRO-DIAS, M.C. Effects of salts on *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under stress conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 56, p. 191–197, 2000.

ALMAGRO, A.; PRISTA, C.; BENITO, B.; LOUREIRO-DIAS, M.C.; RAMOS, J. Cloning and expression of two genes coding for sodium pumps in the salttolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, p. 3251–3255, 2001.

ARANHA, D.A.D. **Dissertação: Aluminum effects toward alcoholic fermentation**. Piracicaba, 2002, 86 p.

BARBOSA, M.F.S.; DE MEDEIROS, M.B.; DE MANCILHA, I.M.; SCHNEIDER, H.; LEE, H.; Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 3, p. 241–251, 1988.

BARBOSA, F.F.; TOKACH, M.D.; DEROUCHÉY, J.M.; GOODBAND, R.D.; NELSEN, J.L.; DRITZ, S.S. Variation in chemical composition of soybean hulls. **Swine Day**, p.158-165, 2008.

BRUINENBERG, P.M.; de BOT, P.H.M.; van DIJKEN, J.P.; SCHEFFERS, W.A. 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.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; SILVA, J. B. A. Xylitol bioproduction from wheat straw: hemicellulose hydrolysis and hydrolyzate fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 86, p. 1371 – 1376, p. 2006.

CANAKCI, M.; SANLI, H. Biodiesel production from various feedstocks and their effects on the fuel properties. **Journal of Industrial and Microbiology Biotechnology**, v. 35, p. 431-441, 2008.

CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L. C.; LOPES, S.; PARAJÓ, J. C.; PEREIRA, H.; GÍRIO, F.M. Supplementation requirements of brewery's spent grain hydrolysate for biomass and xylitol production by *Debaryomyces hansenii* CCMI 94. **Journal of Industrial and Microbiology Biotechnology**, v. 33, p. 646–654, 2006.

COHEN, R.; SUZUKI, M.R.; HAMMEL, K.E. Processive Endoglucanase Active in Crystalline Cellulose Hydrolysis by the Brown Rot Basidiomycete *Gloeophyllum trabeum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, n. 5, p. 2412–2417, 2005.

CORREDOR, D.Y.; SUN, X. S.; SALAZAR, J. M.; HOHN, K. L.; WANG, D. Enzymatic Hydrolysis of Soybean Hulls Using Dilute Acid and Modified Steam-Explosion Pretreatments. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 2, p. 1-8, 2008.

DELGENES, J.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J.M. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 19, p. 220–225, 1996.

DELGENES, J.P.; ESCARE, M.C.; LAPLACE, J.M.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J.M. Biological production of industrial chemicals, i.e. xylitol and ethanol, from lignocelluloses by controlled mixed culture systems. **Industrial Crops and Products**, v. 7, p.101–111, 1998.

DUNNIG, J.W.; DALLAS, D.E. Analytical procedures for control of saccharification process. **Analytical chemistry**, v. 21 (6), p. 727-129, 1949.

DU PREEZ, J.C.; BOSCH, M.; PRIOR, B.A. The fermentation of hexose and pentose sugars by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 228–233, 1986.

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.

EKSIOGLU, S. D.; ACHARYA, A.; LEIGHTLEY, L.E.; ARORA, S. Analyzing the design and management of biomass-to-biorefinery supply chain. **Computers & Industrial Engineering**, v. 57, p.1342–1352, 2009.

EMBRAPA. Embrapa Soja. Dados econômicos. Londrina, 2009. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/index>. Acessado em 20/01/2010.

EMODI, A. Xylitol. Its properties and food applications. **Food Technology**, Chicago, v.32, n.1, p.28 – 32, 1978.

FELIPE, M.G.A.; VIEIRA, D.C.; VITOLO, M.; SILVA, S.S.; ROBERTO, I.C.; MANCILHA, I.M. Effect of acetic acid on xylose fermentation by *Candida guilliermondii*. **Journal of Basic Microbiology**, Berlin, v.35, n.3, p.171-177, 1995.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: Chemistry, Ultrastructure**, Reactions. Berlin: Walter de Gruyter, 1989, 613p.

FU, N.; PEIRIS, P.; MARKHAM, J.; BAVOR, J. A novel co-culture process with *Zymomonas mobilis* and *Pichia stipitis* for efficient ethanol production on glucose/xylose mixtures. **Enzyme and Microbial Technology**, v.45, p. 210–217, 2009.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment of Lignocellulosic Materials for Efficient Bioethanol Production. Advance. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 108, p. 41–65, 2007.

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

GOES, T.; MARRA R. Biocombustíveis – Uma alternativa para o mundo, uma oportunidade para o Brasil. Disponível em: <http://www.embrapa.br/imprensa/artigos/2008>. Acessado em 20/01/2009.

GONG, C.S.; CLAYPOOL, T.A.; McCracken, L.D.; MANN, C.M.; UENG, P.P.; TSAO, G.T. Conversion of pentoses by yeasts. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 25, p. 85–102, 1983.

GONZALEZ-HERNANDEZ, J.C.; CARDENAS-MONROY, C.A.; PENA, A. Sodium and potassium transport in the halophilic yeast *Debaryomyces hansenii*. **Yeast**, v. 21, p. 403–412, 2004.

GOUVEIA, E. R., NASCIMENTO, R.T., SOUTO-MAIOR, A. M., ROCHA, G. J. M. Avaliação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v.32 (6), 1500-1503, 2009.

HAHN-HAGERDAL, B.; KARHUMAA, K.; FONSECA, C.; SPENCER-MARTINS, I.; GORWA-GRAUSLUND, M.F. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 74; p. 937-953, 2007.

HENDRICKS, A.T.W.M. ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 10-18, 2009.

HINFRAY, C; JOUENNE, T; JUNTER, G.A.; Simultaneous saccharification and fermentation of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida shehatae* co-immobilised in a double chambered bioreactor. **Biomass for energy environment agriculture and industry**, v. 2. Elsevier, Oxford, p. 1291±1302, 1995.

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

HOFRICHTER, M. Review: Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, p. 454-466, 2002.

HORWIITZ, W. (Ed.). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 12. Ed. Washington: AOAC, 1975, cap. 2, p. 15. Modificado por ICTA – UFRGS.

IRICK, T.J.; WEST, K.; BROWNELL, H.H.; SCHWALD, W.; SADDLER, J.N. Comparison of colorimetric and HPLC techniques for quantitating the carbohydrate components of steam-treated wood. Scientific note. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 17, p. 137- 149, 1988.

LASER, M.; SCHULMAN, D.; ALLEN, S. G.; LICHWA, J.; ANTAL, M. J.; LYND, L. R. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. **Bioresource Technology**, v. 81, p. 33–44, 2002.

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.; SHI, N.Q. Genetic engineering for improved xylose fermentation by yeasts. **Advances in Biochemical Engineering Biotechnology**, v. 65, p. 117-161, 1999.

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.

KABEL, M.A.; CARVALHEIRO, F.; GARROTE, G.; AVGERINOS, E.; KOUKIOS, E.; PARAJO, J.C.; GÍRIO, F.M.; SCHOLS, H.A.; VORAGEN, A.G.J. Hydrothermally treated

xylan rich by-products yield different classes of xylo-oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 50, p. 47–56, 2002.

KAMM, B.; KAMM, M. Principles of biorefineries. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 64, p.137–145, 2004.

KIM, J.; YUN, S. Discovery of Cellulose as a Smart Material. **Macromolecules**, v.39, p.4202-4206, 2006.

KRISTENSEN, J.B.; THYGESEN, L.G.; FELBY, C.; JORGENSEN, H.; ELEDER, T. Cell-wall structural changes in wheat straw pretreated for bioethanol production. **Biotechnology for Biofuels**, v. 1 (5), p. 1-9, 2008.

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.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v.35, p. 377-391, 2008.

LATIF, F.; RAJOKA, M.I. Production of ethanol and xylitol from corn cobs by yeasts. **Bioresource Technology**, v.77, p. 57-63, 2001.

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

LIU, H.J.; LIU, D.H.; ZHONG, J.J. Quantitative response of trehalose and glycerol syntheses by *Candida krusei* to osmotic stress of the medium. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 473–476, 2006.

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

MALESZKA, R.; SCHNEIDER, H. Fermentation of D-xylose, xylitol, and D-xylulose by yeasts. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 28, p. 360-363, 1982.

MAPA/CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Anuário Estatístico da agroenergia 2009**. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Brasília, 161p.

MARGEOT, A.; HAHN-HAGERDAL, B.; EDLUND, M.; SLADE, R.; MONOT, F. New improvements for lignocellulosic ethanol. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p. 372–380, 2009.

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

MCMILLAN, J.D.; Pretreatment of lignocellulosic biomass. In: Himmel, M.E., Baker, J.O., Overend, R.P. (Eds.), *Enzymatic Conversion of Biomass for Fuels Production* (Symposium, Series 566). **American Chemical Society, USA**, pp. 293/324, 1994.

MERICO, A.; SULO, P.; PISKUR, J.; COMPAGNO, C. Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. **FEBS Journal**, v. 274, p. 656-666, 2007.

MIELENZ, J. R.; BARDSLEY, J. S.; WYMAN, C. E. Fermentation of soybean hulls to ethanol while preserving protein value. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 3532–3539, 2009.

MEYRIAL, V.; DELGENES, J.P.; MOLETTA, R.; NAVARRO, J.M. Xylitol production from D-xylose by *Candida guilliermondii*: fermentation behaviour. **Biotechnology Letters**, v. 13, p. 281–286, 1991.

MIRON, J.; YOSEF, E.; BEN-GHEDALIA, D. Composition and in vitro digestibility of monosaccharide constituents of selected byproduct feeds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 2322-2326, 2001.

MONIRUZZAMAN, M. Ethanol production from AFEX pretreated corn fiber by recombinant bacteria. **Biotechnology Letters**, v.18, p. 985±990, 1996.

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

MUSSATTO, S.I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I.G. Kinetic Behavior of *Candida guilliermondii* Yeast during Xylitol Production from Brewer's Spent Grain Hemicellulosic Hydrolysate. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 1352-1356, 2005.

MUSSATTO, S.I.; ROBERTO, I.C. Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 81, p. 268-274, 2006.

NEVES, M.L.; OLIVEIRA, R.P.; LUCAS, C.M. Metabolic flux response to salt-induced stress in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. **Microbiology**, v. 143, p. 1133–1139, 1997.

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

NILE - New Improvements for ligno-cellulosic Ethanol project. Agência Eurec. Disponível em: <http://www.nile-bioethanol.org/>. Acessado em 20/01/2010.

NOLLEAU, V.; PREZIOSI BELLOY, L.; DELGENES, J.P.; NAVARRO, J.M. Xylitol production from xylose by two strains: sugar tolerance. **Current Microbiology**, v. 27, p. 191–197, 1993.

OCTAVE, S.; THOMAS, D. Biorefinery: Toward an industrial metabolism. **Biochimie**, v.91, p. 659–664, 2009.

OJAMO, H.; YLINEN, L.; LINKO, M. **Process for the preparation of xylitol from xylose by cultivation *Candida guilliermondii***. WO 88.05467, Dep. 08.12.87, Publ. 28.07.88.

ORDAZ, L.; LÓPEZ, R.; MELCHY, O.; DE LA TORRE, M. Effect of high-cell-density fermentation of *Candida utilis* on kinetic parameters and the shift to respiro-fermentative metabolism. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, p. 374–378, 2001.

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

PARAJÓ, J. C.; DOMINGUEZ, H.; DOMINGUEZ, J. M. Improved xylitol production with *Debaryomyces hansenii* Y-7426 from raw or detoxified wood hydrolysates. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, p. 18-24, 1997.

PARAJÓ, J.C.; DOMINGUEZ, 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.

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

PERRY, R.H.; GREEN, D.W. **Perry's Chemical Engineering Handbook**. Seven edition. Nova York: Mc Graw-Hill, 1997.

PRISTA, C.; ALMAGRO, A.; LOUREIRO-DIAS, M.C.; RAMOS, J. Physiological basis for the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 4005–4009, 1997.

RATTANACHOMSRI, U.; TANAPONGPIPAT, S.; EURWILAICHITR, L.; CHAMPREDA, V. Simultaneous non-thermal saccharification of cassava pulp by multi-enzyme activity and ethanol fermentation by *Candida tropicalis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 107 (5), p. 488–493, 2009.

READING, N.S.; WELCH, K.D.; AUST, S.D. Free radical reactions of wood-degrading fungi. In: Wood Deterioration and Preservation: Advances in Our Changing World, **Washington: ACS Symposium Series**, v 845, p.16-31, 2003.

RYBAROVA, J.; ADAMEK, L. Determination of maximum concentrations of aluminum and free chlorine in treated water to be used for making feed yeast. **Kuasny Prom.**, v. 21 (6), p.126-129, 1975.

ROCHA, G.J.M. Deslignificação de bagaço de cana de açúcar assistida por oxigênio. Tese (Doutorado em Química), IQSC, USP, São Carlos, p. 136, 2000.

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.

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.; MUSSATTO, S.I.; RODRIGUES, R.C. Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor. **Industrial Crops and Products**, v. 17, p. 171-176, 2003.

SAHA, B.C.; WOODWARD, J. Fuels and Chemicals from Biomass. **Ed. American Chemical Society**, Washington, DC, 1997.

SCHIRMER-MICHEL, A. C.; FLÔRES, S. H.; HERTZ P. F.; MATOS, G. S.; AYUB, M.A.Z. Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2898–2904, 2008.

SCHIRMER-MICHEL, A. C.; FLÔRES, S. H.; HERTZ P. F.; AYUB, M.A.Z. Effect of oxygen transfer rates on alcohols production by *Candida guilliermondii* cultivated on soybean hull hydrolysate. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 84, p. 223–228, 2009.

SILVA, D.J.; QUEIROZ, A.C. **Análise de alimentos: Métodos Químicos e Biológicos**. Third ed., UFV, Brazil, 2005.

SILVERSTEIN, R.A.; CHEN, Y.; SHARMA-SHIVAPPA, R.R.; BOYETTE, M.D.; OSBORNE, J. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 3000–3011, 2007.

SINGH, A.; MISHRA, P. Microbial Pentose Utilization. **Current applications in Biotechnology Progress in Industrial Microbiology**, v.33, 1995.

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.

SKOOG K.; HAHN-HÄGERDAL B. Xylose fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, p. 66–80, 1988.

STAMBUK, B.U.; ELEUTHERIO, E.C.A.; FLOREZ-PARDO, L.M.; SOUTO-MAIOR, A.; BOM, E.P.S. Brazilian potential for biomass ethanol: Challenge of using hexose and pentose co-fermenting yeast strains. **Journal of Scientific & Industrial Research**, v. 67, p. 918-926, 2008.

SALVI, D. A.; AITA G. M.; ROBERT, D.; BAZAN, V. Ethanol production from sorghum by a dilute ammonia pretreatment. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 37, p. 27–34, 2010.

SUGAI, J.K.; DELGENES, J.P. Catabolite repression of aldose reductase activity and utilization of mixed hemicellulosic sugars in *Candida guilliermondii*. **Current Microbiology**, v. 31, p. 239–244, 1995.

SUN, J.X., SUN, X.F., SUN, R.C., SU, Y.Q. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 195–204, 2004.

SUN, J.X.; XU, F.; SUN, X.F.; XIAO, B.; SUN, R.C. Physico-chemical and thermal characterization of cellulose from barley straw. **Polymer Degradation and Stability**, v. 88, p. 521–531, 2005.

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

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, 2009. Disponível em: <<http://www.fas.usda.gov/psdonline>> Acesso em: Novembro 2009.

VELKOVA, K.; SYCHROVA, H. The *Debaryomyces hansenii* NHA1 gene encodes a plasma membrane alkali-metal-cation antiporter with broad substrate specificity. **Gene**, v. 369, p. 27–34, 2006.

VILLA, P.; FELIPE, M.G.A.; RODRIGUEZ, R.C.L.; VITOLO, M.; LUIS DOS REIS, E.; SILVA, S.S.; NAPOLES, A.I.; MANCILHA, I.M. Influence of phenolic compounds on the bioprocess of xylitol production by *Candida guilliermondii*. in: Esbes-2 **European Symposium on Biochemical Engineering Science**, 2. Porto-Portugal, 1998.

VISSER W.; SCHEFFERS W.A.; BATENBURG-VAN DER VEGTE, W.H.; VAN DIJKEN, J.P. Oxygen requirements of yeasts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 3785–3792, 1990.

von SIVERS, M.; ZACCHI, G.; OLSSON, L.; HAHN-HAGERDAL, B. Cost analysis of ethanol production from willow using recombinant *Escherichia coli*. **Biotechnology Progress**, v. 10, p. 555–560, 1994.

WALFRIDSSON, M.; HALLBORN, J.; PENTTILA, M.; KERANEM, S.; HAHN-HAGERDAL, B. 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.

WHITE, J. Toxic action of common elements towards yeast growth. **London: Chapman & Hall**, p. 286-293, 1954.

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.

WYMAN, C.E. Potential Synergies and Challenges in Refining Cellulosic Biomass to Fuels, Chemicals, and Power. **Biotechnology progress**, v. 19 (2), p. 254–262, 2003.

YABLOCHKOVA, E.N.; BOLOTNIKOVA, O.I.; MIKHAILOVA, N.P.; NEMOVA, N.N.; GINAK, A.I. 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.

ZALDIVAR, J.; MARTINEZ, A.; INGRAM, L.O. Effect of alcohol compounds found in hemicellulose hydrolysate on growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v.68, p.524–530, 2000.

ZHANG, W.; FRANCO, C. Characterizing the heterogeneity of an immobilized cell gel matrix. **Engineering in Life Science**, v.2, p.409-414, 2002.

ZHANG, W. Reviving the carbohydrate economy via multi-product lignocellulose biorefineries. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.35, p.367-375, 2008.

## **APÊNDICE 1**

Primeiro artigo intitulado “Optimization of soybean hull acid hydrolysis and its characterization as substrate for bioprocesses” foi submetido ao periódico Bioresource Technology.

## **Optimization of soybean hull acid hydrolysis and its characterization as substrate for bioprocesses**

**Ana Cassales, Priscila Brasil de Souza-Cruz, Rosane Rech, and Marco Antônio Záchia Ayub\***

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

### **ABSTRACT**

Present global soybean production generates about 17 millions tons of lignocellulosic by-products that can be converted into bioethanol and other bioprocess molecules. In this work, the chemical composition and the kinetics of diluted acid hydrolysis of soybean hull were investigated. The chemical composition of soybean hull showed a content of approximately 40% of cellulose, 26% of xylose, 9% of lignin, and 13% of proteins. Hydrolyses were carried out under different conditions of temperature and acid concentrations following a  $2^2$  central composite design to evaluate the release of fermentable sugars (glucose, xylose, and arabinose), and toxic compounds (furfural, hydroxymethylfurfural, acetic acid, and soluble lignin). An objective function was defined to estimate the best treatment for high sugar release and low toxic compounds generation. The kinetics of hydrolyses showed that the best condition for recovering sugars was 153 °C and 1.8 mmol de  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{g DM}$  for 60 minutes with a hydrolysis efficiency of 87%. The objective function, considering a non-inhibiting concentration of toxic compounds ( $< 4 \text{ g L}^{-1}$ ), was 118

---

\* Corresponding author. Tel.: +55 51 33086685; fax: +55 51 33087048.  
E-mail address: [mazayub@ufrgs.br](mailto:mazayub@ufrgs.br) (MAZ Ayub).

°C and 2.8 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> /g DM in 40 minutes with 59% of hydrolysis efficiency, producing 11% xylose, 5% arabinose, and 2% glucose.

**Keywords:** Soybean hull; Diluted acid hydrolysis; fermentable sugars; growth inhibitors; substrates for bioprocesses.

## 1. Introduction

Soybean is one of the most cultivated crops in the world, with a global production around 210 millions tons (Embrapa, 2009), generating about 17 millions tons of hull, the major by-product of processing this seed, which represents 8 to 10% of the whole composition of the grain (Gnanasambandan and Proctor, 1999). Despite the large amount generated, soybean hull has received little attention as a low-cost raw material and its use is still limited to animal feeding.

Soybean hull is basically lignocellulosic material composed of fermentable sugars, polymerized as cellulose (glucose) and hemicellulose (xylose and arabinose) (Jeffries and Jin, 2000), and a small proportion of lignin (phenolic compounds), as compared to other residues such as rice hulls and straw, sugarcane bagasse, and wheat straw (Saha et al., 2005; Martín and Thomsen, 2007; Thomsen et al., 2007). Therefore, its hydrolysis to liberate fermentable sugars is potentially interesting for bioconversion into bioethanol and other fine chemicals such as xylitol (Schirmer-Michel et al, 2008). There are still unsolved questions relating the economic viability of hydrolysis processes of lignocellulosic substrates. Acid concentration, temperature, reaction times, amount of fermentable sugars and toxic compounds generated are considered important factors. The treatment with diluted acids can be carried out with sulfuric, nitric, or chloridric acid and is already been used for other agroindustrial residues such as corn stovers and sugarcane bagasse (Silverstein et al., 2007). The normally low

concentrations of acids used in this type of hydrolysis are advantageous because recovery of the acid may not be required (Iranmahboob et al., 2002) and it is effective for the solubilization of hemicellulose, turning the cellulose easily accessible for further enzymatic hydrolysis (Hendriks and Zeeman, 2009).

High depolymerization rates can be obtained by either diluted or concentrated acid hydrolysis of lignocellulosic materials. However, depending on the conditions, toxic degradation compounds of sugars and lignin could be generated such as furfural, 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF), 4-hydroxybenzaldehyde (4-HB), vanillin, syringaldehyde, and acetic acid, which are inhibitors of microorganism growth during fermentation (Galbe and Zacchi, 2007; Mussato and Roberto, 2004). According to Palmqvist and Hahn-Hägerdal (2000), when high temperatures and pressures are used, glucose and xylose could be degraded to form furfural and hydroxymethylfurfural (HMF), respectively. When furfural and HMF are degraded, formic and levulinic acids are formed, while phenolic compounds are generated from the partial degradation of lignin. In the light of the complexity of hydrolyses systems, the aims of this work were to characterize soybean hull as a potential raw material for biorefineries and to develop the acid hydrolysis in order to achieve maximal yields of sugars (glucose, xylose, and arabinose), while minimizing the liberation of microbial inhibitory compounds. The kinetics of hydrolysis reaction under different conditions of temperature and acid concentration was performed to establish the ideal time for the reaction, following a central composite design (CCD), which was applied to optimize temperature and acid concentration ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Finally, an objective function was proposed in order to obtain an ideal diluted acid hydrolysis condition to maximize sugar release yields, while maintaining inhibitors concentration below toxic levels.

## 2. Methodology

### 2.1. Chemical characterization of soybean hull

Soybean hull (SH) were kindly supplied by The Solae Company (Esteio, Brazil). The hulls were milled to a particle size  $< 1$  mm in diameter and stored until further processing or analysis. Soybean hull was submitted to quantitative acid hydrolysis with 72% (w/w) sulfuric acid, following methodology described by Dunnig and Dallas (1949). The monosaccharides and acetic acid liberated by hydrolysis were determined by HPLC in order to estimate (after corrections for stoichiometry and sugar decomposition, see item 2.3.) the contents of cellulose (as glucan), hemicelluloses (as xylan and arabinan), and acetyl groups. The acid soluble lignin was determined by UV-spectrophotometry (see item 2.3.). Protein was determined as total nitrogen content by the Kjeldahl method (Horwitz, 1975), using the  $N \times 6.25$  conversion factor. Ashes were determined by weight difference before and after incineration of the soybean hull sample in a muffle furnace at 600 °C for 4 h (Silva and Queiroz, 2005). The mineral content was determined by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-AES). All determinations were carried out in duplicate.

### 2.2. Experimental design and acid hydrolysis kinetics

The kinetic of acid hydrolysis was performed under different conditions following a  $2^2$  central composite design (CCD), with three replicates in the central point. Two independent variables, temperature and sulfuric acid concentration, were tested for the soybean hull hydrolysis. Liquid-to-solid ratio was fixed in 1:10 (w/w) based in a previous experimental design (our unpublished results). The assays were carried out in stainless steel reactors designed and constructed in our lab, with 100 mL volume, containing the previously milled soybean hull and the acid solution. The reactors were immersed in silicon at different

temperatures for 10, 20, 30, 40, 50, and 60 minutes. After hydrolysis, the solid material was separated by filtration and the filtrate was analyzed for composition. The concentration of glucose, xylose, arabinose, acetic acid, furfural, HMF, and soluble lignin were the dependent variables or responses. An objective function was developed using the software Matlab 6.0 in order to define the best treatment for higher liberation of sugars and lower formation of acetic acid, furfural, soluble lignin, and HMF. All experiments were carried out in duplicates in randomized run order. This design allowed the estimation of the significance of the parameters and their interaction using the F-test. Results were evaluated with Statistica 7.0 software.

### 2.3. Analytical methods

Hydrolysed samples were analyzed by HPLC. Glucose, xylose, arabinose, and acetic acid concentrations were determined with a refractive index (RI) (Shimadzu) detector and a Bio-Rad HPX-87H (300 × 7.8 mm) column at 45°C, using 0.005 M sulfuric acid as eluent, flow rate of 0.6 mL/min and sample volumes of 20 µL. Furfural and hydroxymethylfurfural were determined with a UV detector (at 276 nm) and a Nucleosil C18 5-µm pore size (250 × 4.6 mm) column at room temperature, using acetonitrile–water (2:8) containing 10 g L<sup>-1</sup> acetic acid as eluent, flow rate of 1.1 mL min<sup>-1</sup> and sample volumes of 20 µL. Soluble lignin (SL) was estimated by UV spectrophotometry at 280 nm (Gouveia et al., 2009).. The pH of hydrolysed samples were raised to 12 with 6 M NaOH and this solution was diluted with distilled water in order to obtain an absorbance reading not exceeding 1 unit of absorbance. The SL concentration was then calculated according to the following equations (Gouveia et al., 2009):

$$C_{SL} = 4.187 \times 10^{-2} (A_{LIG\ 280} - A_{PD\ 280}) - 3.279 \times 10^{-4} \quad (1)$$

Where:  $C_{SL}$ , soluble lignin concentration ( $\text{g L}^{-1}$ );  $A_{LIG280}$ , absorbance reading at 280nm after correction for dilution;  $A_{PD280}$  is the absorbance of sugar degradation products and can be calculated according to Equation 2:

$$A_{PD280} = C_F \beta_F + C_{HMF} \beta_{HMF} \quad (2)$$

Where:  $C_F$  and  $C_{HMF}$  are furfural and HMF concentrations determined by HPLC, respectively;  $\beta_F$  and  $\beta_{HMF}$  are the furfural ( $146.85 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) and HMF ( $114 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) extinction coefficients at 280 nm, respectively.

The yields of recovered sugar ( $YS$ , in g of sugar that can be obtained from 100 g of soybean hull) and the hydrolysis efficiency ( $\eta$ , %) were calculated using the following equations:

$$YS = (CV / M) \times 100 \quad (3)$$

$$\eta = (YS / Y_{\max}) \times 100 \quad (4)$$

Where:  $C$  is the concentration of the component in the liquid phase ( $\text{g L}^{-1}$ );  $M$  is the amount of soybean hull (dry matter) used in the experiment (g);  $V$  is the volume of liquid solution (L);  $Y_{\max}$  is the maximal yield of recovered sugars (g per 100 g dry matter).

### 3. Results and discussion

#### 3.1. Soybean hull composition

The chemical composition of SH varies depending on the processing technology, plant genetics, soil, growth conditions, among other factors. The percentage composition of the soybean hull used in this work is shown in Table 2, with values determined on a dry basis. As for other residues, glucose is the main component of polysaccharide fraction of SH (39.7%), followed by the pentoses xylose (19.6%), and arabinose (5.9%), respectively. The other components were glucuronic and acetic acids (2.6%), cellobiose (1.6%), lignin (8.1%), proteins (13.1%), ashes (0.6%), and extractives (3.2%). Results suggest an interesting composition of the SH for bioconversion of fermentable sugars into bioethanol because of its very low content of lignin, since the degradation of this macromolecule produces toxic compounds to microorganisms (Mussatto and Roberto, 2004). Other raw materials such as brewers spent grain, sugarcane bagasse, rice and wheat straw have around 28%, 18%, 17% and 23% lignin, respectively (Mussatto and Roberto, 2006; Sun et al., 2004; Sun et al., 2005; Kristensen et al., 2008). Lignin is associated with polyols by physical interactions and covalent bonds, giving cohesion to the internal structure and resistance to chemical and physical stress (Hofrichter, 2002). Therefore, the low lignin content eases the process of diluted acid hydrolysis of soybean hull, as cellulose and hemicellulose become readily exposed to acid attack.

The protein content found in this work (13.1%) was within the range reported in the literature, varying from 10 to 14% (Miron et al., 2001, Corredor et al., 2008, Mielenz et al., 2009). This relatively high protein content of SH may be an interesting aspect when preparing fermentation broths for bioethanol production because it can replace expensive nitrogen sources, usually used in the formulation.

Soybean hulls have approximately 0.6% of ashes, the lowest content compared to other residues such as brewers spent grain (4.6%), or rice straw (11.4%) (Mussatto and Roberto, 2006, Roberto et al., 2003). Results of the ICP-AES analysis are shown in Table 2. Aluminum appears as the major mineral, followed by zinc and manganese. The presence of heavy metals in media can interfere with metabolic pathways of microorganisms and inhibit the production of enzymes (Mussatto and Roberto, 2004). Aluminum, in its ionized  $Al^{+3}$  form, has a toxic microbial action characterized by the reduction of biomass formation, diverting sugar for ethanol formation, while the presence of  $Mg^{2+}$  cations relieves toxicity of aluminum in various biological systems, including yeasts (Jongbloed and Borstpauwels, 1992). The ICP-AES analysis of SH suggest that these minerals can be treated as trace elements, being their concentrations extremely low in the dry fraction.

The composition of SH is shown in Table 3, compared to other lignocellulosic materials. The content of fermentable sugars in SH exceeds 60%, matching the values found for sugarcane bagasse (65%) and rice straw (66%) and are higher than the contents of wheat straw (57%) and brewers spent grain (46%), suggesting that SH is a very promising substrate for the bioconversion into products of high added value. The composition of SH sugars found in this work is similar with data reported by other authors, the differences among values being explained by the natural variations of plant origin, classification, and processing technologies.

### *3.2. Kinetics of hydrolysis*

Kinetic of SH hydrolysis over a time reaction of 60 minutes was carried out under different conditions of temperature and acid concentration. Conditions of hydrolysis followed the CCD and are shown in Table 1. Figure 1 shows the results of sugar liberation and the formation of toxic compounds. Best conditions for glucose liberation (Fig. 1-A) were 153 °C;

2.8 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DM, treatment 4 (10.2% of hydrolysis efficiency). However, this treatment produced concentrations above 1 g L<sup>-1</sup> of furfural (Fig. 1-E) and 4 g L<sup>-1</sup> of lignin (Fig. 1-G), values considered toxic for microorganisms (Palmqvist & Hahn - Hägerdal, 2000; Delgenes et al., 1996; Villa et al., 1998).

The liberation of xylose was maximal under the conditions of treatment 2 (153 °C; 1.8 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DM, Fig. 1-B), releasing 15.8 g L<sup>-1</sup> (71.1% of hydrolysis efficiency), in 60 minutes. The concentrations of furfural, HMF, and acetic acid remained below the threshold of toxicity for microorganisms (Fig. 1-D, E, F). However, the concentration of soluble lignin was around 4 g L<sup>-1</sup>, being this concentration toxic to *Saccharomyces cerevisiae* according to Parajó et al. (1998). In comparison, treatment 4 (153 °C; 2.8 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DM, Fig. 1-B), which was also very efficient, releasing 14.8 g L<sup>-1</sup> of xylose in only 20 minutes of reaction (67.1% efficiency of hydrolysis), produced a very small amount of furfural, 0.6 g L<sup>-1</sup>, and soluble lignin, 3.5 g L<sup>-1</sup>, still below toxicity levels. This process could be used in an industrial scale, since reduction of reaction time and lower concentration of toxic compounds will be cost effective.

The release of arabinose was maximal in treatments 2 (153 °C; 1.8 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DM), and 7 (135 °C; 3 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DM), both highly efficient, (97% and 93% efficiency of hydrolysis, respectively), producing 6.5 g L<sup>-1</sup> and 6.3 g L<sup>-1</sup> in 60 minutes and 40 minutes of reaction, respectively. In this case, treatment 7 may be more cost-effective for industry, as it uses lower temperature and short reaction time.

Using 2% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> at 140 °C for 30 minutes, followed by modified steam explosion, Corredor, et al. (2008) reported pentose yields of 96% and no significant liberation of hexoses for SH. Our similar conditions of 135 °C; 2.25 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DM, but without the modified steam explosion procedure, showed an efficiency of 67% for pentose.

Acetic acid did not exceed  $3 \text{ g L}^{-1}$  for any tested treatment, amount that is considered toxic to many microorganisms (Felipe et al. 1995). For furfural and HMF, results showed that temperatures above  $150 \text{ }^{\circ}\text{C}$  and acid concentrations higher than  $2 \text{ mmol H}_2\text{SO}_4 \text{ g}^{-1} \text{ DM}$  may lead to the formation toxic levels of these inhibitors for microbial metabolism. Soluble lignin was the most abundant degradation product formed in the hydrolysates, steadily increasing with reaction time. At the severest conditions, soluble lignin reached  $5 \text{ g L}^{-1}$ , concentration considered extremely toxic to microorganisms (Villa et al., 1998).

Considering only the maximal recovery of sugars, treatment 2 ( $153 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ;  $1.8 \text{ mmol H}_2\text{SO}_4 \text{ g}^{-1} \text{ DM}$ ) in 60 minutes of reaction, was the most efficient. However, this condition produces an excessive amount of potentially toxic compounds. If the hydrolysate is destined to biotechnological processes, one step of detoxification would be necessary, which is costly and ineffective (Hendriks and Zeeman, 2009). An interesting alternative would be, therefore, to use the dilute acid hydrolysis, which presents the combination of the highest sugar concentration with the minimal inhibitory concentrations of toxic compounds.

### *3.3. Optimization of temperature and acid concentration for hydrolysis*

Central composite design (CCD) was used to study the effects and the interactions of the two factors that influence the efficiency of hydrolysis for the liberation of sugars, furaldehydes, acetic acid, and soluble lignin (independent variables). Figure 2 shows the response surfaces generated from the analysis of variance for each independent variable. The analysis of variance was evaluated at a significance level of 95% ( $p < 0.05$ ) for all compounds. The lack of fit of the equations was checked in all cases and was not significant for any of them, which shows that the quadratic model was appropriate to fit the results.

For the release of glucose, the linear temperature was the only significant factor affecting this reaction. The analysis of variance for the liberation of pentoses, xylose, and

arabinose, showed the significant influence of temperature (linear and quadratic), and acid concentration (linear), as well as the interaction between them. For xylose, the best temperature was 125 °C, while for arabinose the best range was between 125 and 135 °C. Although no critical point was found for the tested acid range (1.5 - 3 mmol g<sup>-1</sup> DM), it showed a positive influence on the xylose and arabinose liberation. Mussatto and Roberto (2006) showed that the concentration of acid was positively significant for the release of xylose from brewers spent grain, while the solid-liquid ratio was significantly negative. Canilha et al. (2006) tested different temperatures and acid concentrations (120-140 °C and 100-200 mg of sulfuric acid g<sup>-1</sup> DM) for the recovery of xylose from wheat straw, and found both variables significant for sugar release, with best conditions at 140 °C and 200 mg of sulfuric acid g<sup>-1</sup> DM.

Acetic acid production was significantly influenced by temperature (linear) and acid concentration (linear). There were no critical values for temperature and acid concentration in the tested range, suggesting that the increase of temperature and acid concentration will also increase the formation of this organic acid. For furfural, all factors and interactions were significant, with the exception of acid concentration (quadratic). In this case, it was possible to optimize both the temperature (130.3 °C) and the acid concentration (1.54 mmol g<sup>-1</sup> DM) in order to minimize its formation during hydrolysis. HMF generation was significantly affected by temperature (linear and quadratic) and sulfuric acid concentration (linear), with the lowest concentrations obtained for 116 °C and 2 mmol g<sup>-1</sup> DM. Finally, for the release of lignin, temperature (linear) and acid concentration (linear) were significantly positive, contrasting with results for the hydrolysis of brewers spent grain as reported by Mussatto and Roberto (2006), who found that the acid concentration was significantly negative to lignin release of this substrate. However, it is important to note that SH has only a third of lignin content of brewers spent grain, and we used harsher conditions of hydrolysis.

### 3.4. Modeling the objective function

An objective function was proposed in order to maximize sugars liberation, while reducing toxic compounds below their microbial toxicity thresholds. Concentrations of glucose, xylose, arabinose, acetic acid, furfural, HMF, and soluble lignin were expressed by the equations generated based on the CCD analysis and are shown in Table 4. The function ( $F_{obj}$ ) was proposed taking into account to the synergistic effect those toxic compounds may have on the microbial metabolism during the fermentation process. Zaldivar et al. (2000) proposed that the toxicity of hemicellulosic hydrolysates emerges from the aggregation of several toxic compounds (alcohols, aldehydes, and acids), but not from these compounds individually. Therefore, it is extremely difficult to establish the maximal concentration of each inhibitor that can be tolerated by the microorganisms because inhibition strongly depends on series of factors, varying from the biology of the microorganism itself, its adaptation to the medium, the type of fermentative process, among many others (Mussatto and Roberto, 2004). To simulate an ideal condition for the hydrolysis of SH, a conservative limit for the total sum of inhibitors concentration (furfural, HMF, acetic acid, and soluble lignin) was established as  $4 \text{ g L}^{-1}$ , based on the general reports of toxic compounds liberated by various hydrolyses systems (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000; Parajó et al. 1998; Delgenes et al., 1996; Felipe et al., 1995).. Therefore, different weights ( $w$ ) were given to the toxic compounds in the objective function (Equation 5). When the sum of the toxic compounds ( $tox$ , Equation 6) exceeds the concentration of  $4 \text{ g L}^{-1}$  ( $tox > 4$ ), the function will weight  $tox$  10 times ( $w = 10$ ); otherwise, the priority is given to the sum of the concentration of sugars and, in this case,  $w = 0.1$ .

$$F_{obj} = w \cdot tox - (Glu + Xyl + Ara) \quad (5)$$

$$tox = HMF + Fur + HAc + SLg \quad (6)$$

(Definitions of terms in Table 4)

Figure 3 represents the result of the objective function for the diluted acid hydrolysis of SH. The treatment for maximal release of sugars, at the same time keeping the concentration of the sum of furfural, HMF, acetic acid, and soluble lignin below inhibitory levels was: temperature of 118 °C and 2.8 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DM (point 3 in Fig. 3). The efficiency of this treatment was 5% for glucose, 55% for xylose, and 86% for arabinose. The hydrolysis conditions suggested by the objective function (118 °C, 2.8 mmol g<sup>-1</sup> DM, 40 min) were less efficient in releasing sugars compared to the condition for maximal obtained in the kinetic study (153 °C; 1.8 mmol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> g<sup>-1</sup> DM, 60 min), with efficiencies of liberation of glucose, xylose, and arabinose as 8%, 72%, and 97%, respectively, but also generating around 10 g L<sup>-1</sup> of total toxics.

The best condition for sugar release yielded around 87% of total hydrolysis efficiency in 60 minutes, while the objective function produces 59% efficiency in 40 minutes. Although the maximal liberation of sugars exceeded in 28% that predicted by the objective function, time was shortened by 33% under these last conditions and this fact may be cost-effective for the process. Moreover, this last condition would also generate lower concentrations of toxics, eliminating the need of detoxification steps for the bioprocess. Further studies are granted to investigate the effects of enzymatic treatment over the cellulosic residue of SH acid hydrolysis in order to improve the liberation of hexoses.

#### 4. Conclusions

The present study demonstrates the potential use of soybean hull as a substrate for several bioprocesses after its acid hydrolysis. Its sugar composition matches that of other hemicelulosic materials, while its content of toxic compounds compares favorably, with very

low contents of lignin. To present, this raw material, which is produced to exceed 17 million ton yearly, has been largely subutilized as animal feed or simply discharged in the environment. In our work, we tested the best conditions for its diluted acid hydrolysis, investigating the temperature, acid concentration and time kinetics of sugar liberation and toxic compounds formation.

### **Acknowledgements**

The authors wish to thank CNPq and CAPES (Brazil) for their financial support for the project and scholarships (first and second authors).

### **References**

- Canilha, L., Carvalho, W., Silva, J. B. A., 2006. Xylitol bioproduction from wheat straw: hemicellulose hydrolysis and hydrolyzate fermentation. *J. Sci. Food Agricul.* 86, 1371 – 1376.
- Corredor, D.Y., Sun, X. S., Salazar, J. M., Hohn, K. L., Wang, D., 2008. Enzymatic Hydrolysis of Soybean Hulls Using Dilute Acid and Modified Steam-Explosion Pretreatments. *J. Biobased Mater. Bioenergy.* 2, 43-50.
- Delgenes, J., Moletta, R., Navarro, J.M., 1996. Effects of lignocellulose degradation products on ethanol fermentations of glucose and xylose by *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*. *Enzyme. Microbial Technol.* 19, 220–225.
- Dunnig, J.W., Dallas, D.E., 1949. Analytical procedures for control of saccharification process. *Analytical Chem.* 21 (6), 727-129.

- Embrapa, 2009. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Soy Embrapa. Economic data. Londrina. Available at: <http://www.cnpso.embrapa.br/index>. (accessed 20.01.10).
- 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 fermentation to xilitol by *Candida guilliermondii*. J. Basic Microbiol. 35 (3), 171-177.
- Galbe, M., Zacchi, G., 2007. Pretreatment of Lignocellulosic Materials for Efficient Bioethanol Production. Advance. Biochem Engin. Biotechnol. 108, 41–65.
- Gnanasambandan, R., Proctor, A., 1999. Preparation of soy hull pectin. Food Chem. 65, 461-467.
- Hendricks, A.T.W.M. Zeeman, G., 2009. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. Bioresour. Technol. 100, 10-18.
- Hofrichter, M., 2002. Review: Lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). Enzyme Microbial Technol. 30, 454-466.
- Horwitz, W., 1975. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 12. ed. Washington. Modified by ICTA – UFRGS.
- Iranmahboob, J., Nadim, F., Monemi, S., 2002. Optimizing acid hydrolysis: a critical step for production of ethanol from mixed wood chips. Biomass. Bioenergy. 22, 401–404.
- Jeffries, T.W., Jin, Y.S., 2000. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. Appl. Biochem. Biotechnol. 63, 495-509.
- Jongbloed, R.H., borstpauwels, G.W.F.H., 1992. Effects of aluminum and pH on growth and potassium uptake by 3 ectomycorrhizal fungi in liquid culture. Plant. Soil. 140 (2), 157-165.
- Laser, M., Schulman, D., Allen, S. G., Lichwa, J., Antal, M. J., Lynd, L. R., 2002. A comparison of liquid hot water and steam pretreatments of sugar cane bagasse for bioconversion to ethanol. Bioresour. Technol. 81, 33–44.

- Kristensen, J.B., Thygesen, L.G., Felby, C., Jorgensen, H., Eleder, T., 2008. Cell-wall structural changes in wheat straw pretreated for bioethanol production. *Biotechnol. Biofuels*. 1 (5), 1-9.
- Martín, C., Thomsen, A.B., 2007. Wet oxidation pretreatment of lignocellulosic residues of sugarcane, rice, cassava and peanuts for ethanol production. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 82, 174-181.
- Mielenz, J. R., Bardsley, J. S., Wyman, C. E., 2009. Fermentation of soybean hulls to ethanol while preserving protein value. *Bioresour. Technol.* 100, 3532–3539.
- Mussatto, S. I., Roberto, I.C., 2004. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. *Bioresour. Technol.* 93, 1–10.
- Mussatto, S.I., Roberto, I.C., 2006. Chemical characterization and liberation of pentose sugars from brewer's spent grain. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81, 268-274.
- Miron, J.; Yosef, E.; Ben-Ghedalia, D., 2001. Composition and in vitro digestibility of monosaccharide constituents of selected byproduct feeds. *J. Agric. Food Chem.* 49, 2322-2326.
- Gouveia, E. R., Nascimento, R.T., Souto-Maior, A. M., Rocha, G. J. M., 2009. Avaliação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. *Quim. Nova.* 32 (6), 1500-1503.
- Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibition and mechanism of inhibition. *Bioresour. Technol.* 74, 25 – 33.
- Parajó, J.C., Domínguez, H., Domínguez, J.M., 1998. Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. *Bioresour. Technol.* 66, 25–40.

- Roberto, I. C., Mussatto, S. I., Rodrigues, R.C. L.B., 2003. Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor. *Industrial Crops and Products*. 17, 171-/176.
- Saha, B.C., Iten, L.B., Cotta, M.A., Wu, Y.V., 2005. Dilute Acid Pretreatment, Enzymatic Saccharification, and Fermentation of Rice Hulls to Ethanol. *Biotechnol. Prog.* 21, 816-822.
- Schirmer-Michel, A. C., Flôres, S. H., Hertz P. F., Matos, G. S., Ayub, M.A.Z., 2008. Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075. *Bioresour. Technol.* 99, 2898–2904.
- Silva, D.J., Queiroz, A.C., 2005. *Análise de alimentos: Métodos Químicos e Biológicos*. third ed., UFV, Brazil.
- Silverstein, R.A., Chen, Y., Sharma-Shivappa, R. R., Boyette, M.D., Osborne, J., 2007. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. *Bioresour. Technol.* 98, 3000–3011.
- Sun, J.X., Sun, X.F., Sun, R.C., Su, Y.Q., 2004. Fractional extraction and structural characterization of sugarcane bagasse hemicelluloses. *Carbohydr. Polym.* 56, 195–204.
- Sun, J.X., Xu, F., Sun, X.F., Xiao, B., Sun, R.C., 2005. Physico-chemical and thermal characterization of cellulose from barley straw. *Polym. Degrad. Stabil.* 88, 521–531.
- Thomsen, M.H., Thygesen, A., Thomsen, A.B., 2008. Hydrothermal treatment of wheat straw at pilot plant scale using a three-step reactor system aiming at high hemicellulose recovery, high cellulose digestibility and low lignin hydrolysis. *Bioresour. Technol.* 99, 4221-4228.
- Villa, P., Felipe, M.G.A., Rodriguez, R.C.L., Vitolo, M., Luis Dos Reis, E., Silva, S.S., Napoles, A.I., Mancilha, I.M., 1998. Influence of phenolic compounds on the

bioprocess of xylitol production by *Candida guilliermondii*. in: Esbes-2 European Symposium on Biochemical Engineering Science. Porto-Portugal.

Zaldivar, J., Martinez, A., Ingram, L.O., 2000. Effect of alcohol compounds found in hemicellulose hydrolysate on growth and fermentation of ethanogenic *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 68, 524–530.

**Table 1.** The 2<sup>2</sup> central composite design with three replicates in the central point to evaluate the acid hydrolysis of soybean hull.

Assay	Variable	
	Temperature (°C)	Acid concentration (mmol g <sup>-1</sup> dry matter)
1	118	1.7
2	153	1.7
3	118	2.8
4	153	2.8
5	110	2.2
6	160	2.2
7	135	3.0
8	135	1.5
9 *	135	2.2

\* Central point

**Table 2.** Chemical and mineral composition of soybean hull

Component	Concentration (% of dry weight)	Minerals	Concentration (mg/kg of dry weight)
Cellobiose	1.6	Phosphorus	0.0019
Glucuronic acid	2.0	Potassium	0.013
Glucose	39.7	Calcium	0.0057
Xylose	19.6	Magnesium	0.0026
Arabinose	5.9	Sulfur	0.0014
Acetic acid	0.6	Iron	0.0013
HMF	0.4	Zinc	61
Furfural	0.8	Copper	9
Klason lignin	3.4	Manganese	30
Acid-soluble lignin	5.7	Sodium	10
Extractives	3.2	Chromium	3
Ashes	0.6	Aluminium	713
Insolubles	10.7		
Proteins (Nx6.45)	13.1		

**Table 3.** Comparison of soybean hulls chemical composition used in this work with other residues and other compositions of the same reported in the literature.

Lignocellulosic residue	Cellulose (%)	Hemicellulose (%)	Total lignin (%)	Reference
Wheat straw	31.0	26.0	24.0	Canilha, 2006
Rice straw	43.5	22.0	17.2	Roberto et al., 2003
Brewers spent grain	17.0	28.0	23.0	Mussatto and Roberto, 2006
Sugarcane bagasse	38.9	26.2	23.9	Laser et al., 2002
Soybean hull	51.0	16.0	ND*	Miron et al., 2001
Soybean hull	36.4	12.5	18.2	Corredor et al., 2008
Soybean hull	38.4	10.2	2.8	Mielenz et al., 2010
Soybean hull	39.7	25.5	9.1	This work

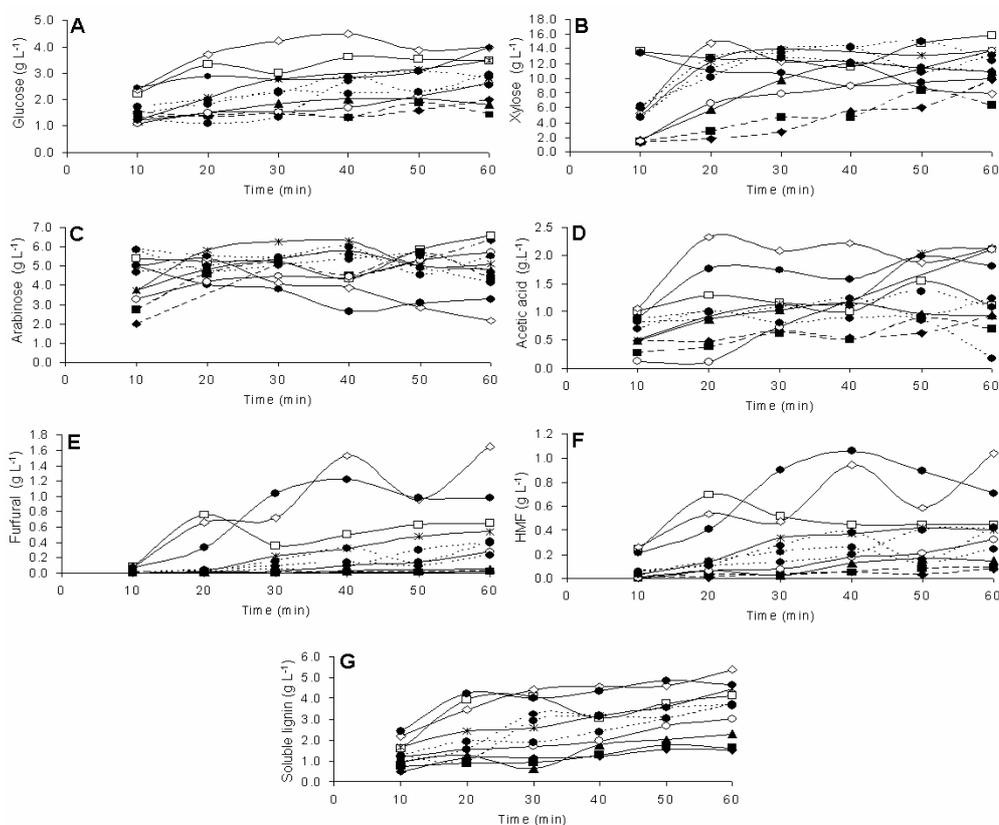
\*ND = Not determined

**Table 4.** Equations of each component used to made de objective function

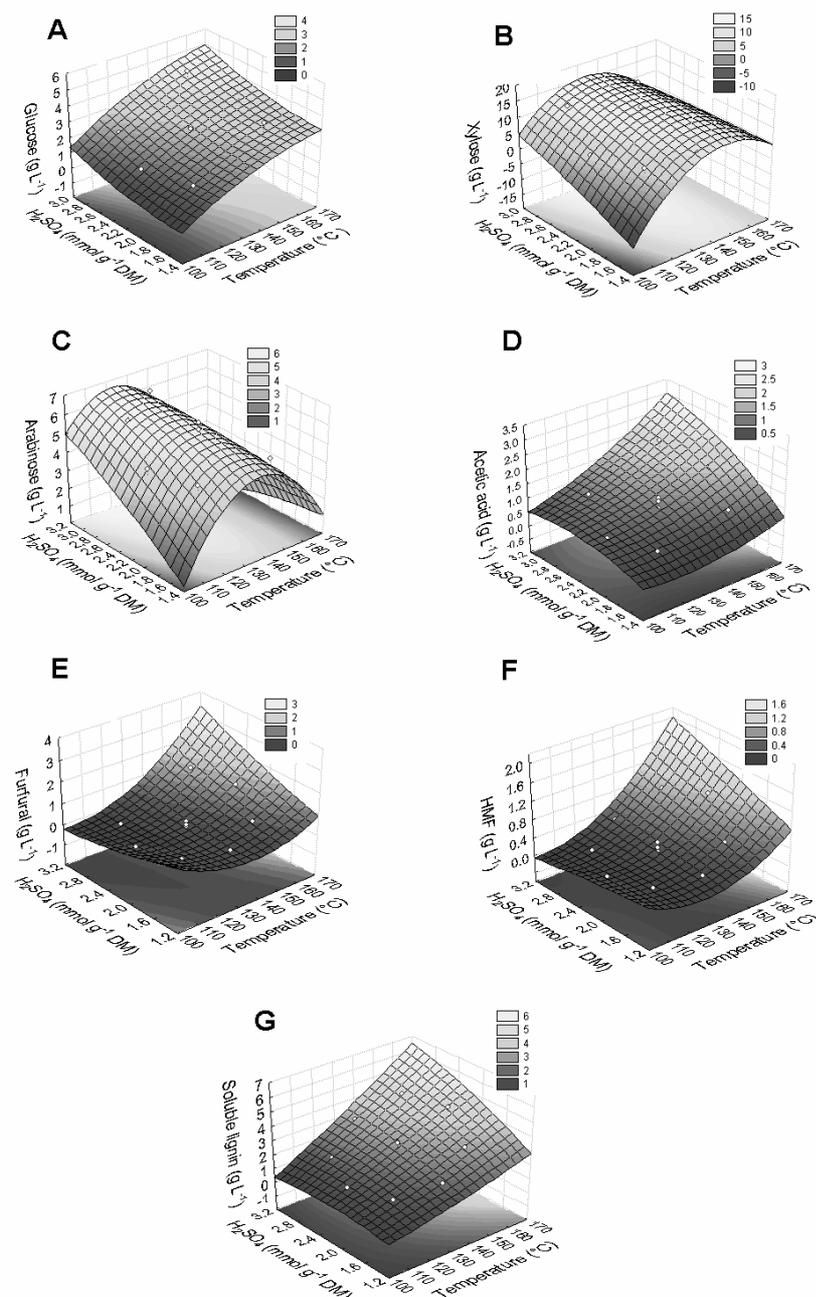
Equation	R <sup>2</sup>
$Glu = 2.496346 + 0.850189 X - 0.145149 X^2 + 0.589961 Y + 0.248470 Y^2 + 0.046682 XY$	0.81397
$Xyl = 13.07084 + 1.83022 X - 3.15268 X^2 + 2.72122 Y - 0.62974 Y^2 - 1.81228 XY$	0.95353
$Ara = 5.62683 - 0.57180 X - 1.00374 X^2 + 0.45616 Y - 0.10717 Y^2 - 0.47677 XY$	0.94277
$HAc = 1.075497 + 0.377258 X + 0.077277 X^2 + 0.418054 Y - 0.117190 Y^2 + 0.143604 XY$	0.87909
$Fur = 0.183857 + 0.463100 X + 0.242313 X^2 + 0.170365 Y + 0.038800 Y^2 + 0.249494 XY$	0.95300
$HMF = 0.278116 + 0.329747 X + 0.132638 X^2 + 0.105625 Y - 0.006021 Y^2 + 0.103383 XY$	0.96828
$SL = 2.726789 + 1.111483 X + 0.041150 X^2 + 0.470072 Y - 0.094802 Y^2 + 0.240750 XY$	0.91742

$X$  = temperature;  $Y$  = acid concentration;  $Glu$  = glucose;  $Xyl$  = xylose;  $Ara$  = arabinose;  $HAc$  = acetic acid ;  $Fur$  = furfural;  $HMF$  = hydromethylfurfural;  $SL$  = soluble lignin

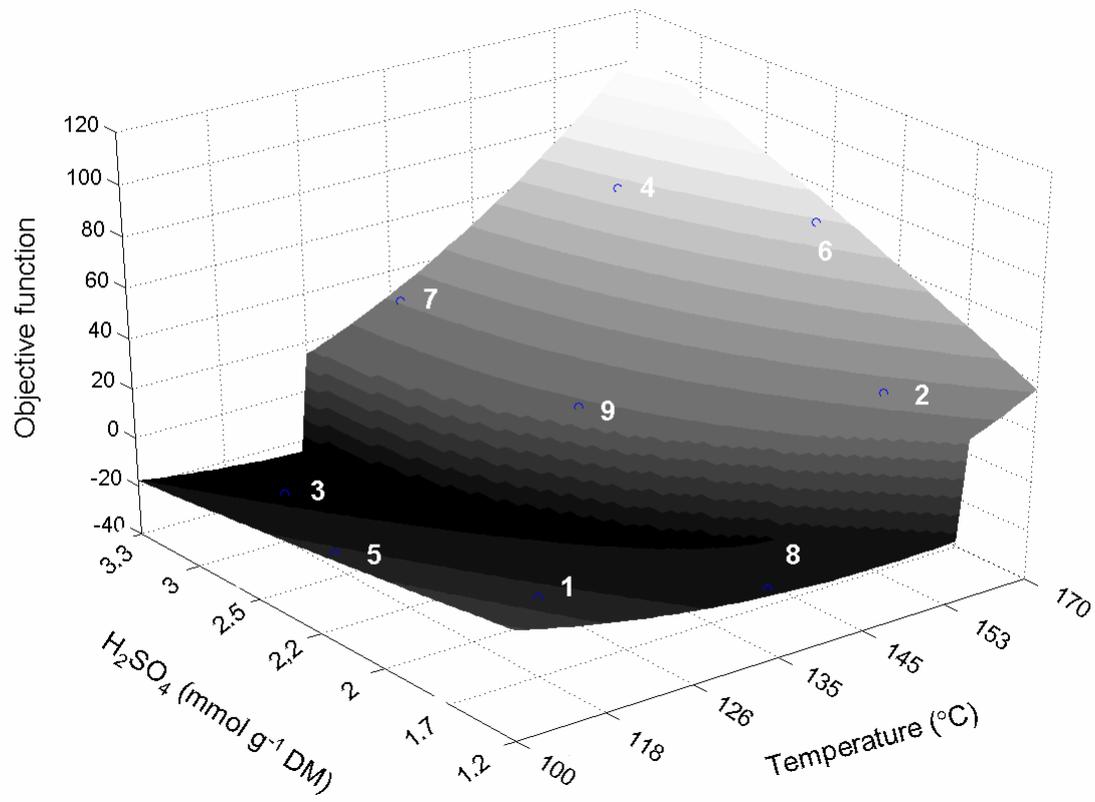
## Figure Captions



**Figure 1.** Kinetics of release of: (A) glucose, (B) xylose, (C) arabinose, (D) acetic acid, (E) furfural, (F) HMF, and (G) soluble lignin, from soybean hull diluted acid hydrolysis during 60 minutes. Conditions: (—◆—) 118 °C; 1.7 mmol g<sup>-1</sup> DM, (—□—) 153 °C; 1.7 mmol g<sup>-1</sup> DM, (—▲—) 118 °C; 2.8 mmol g<sup>-1</sup> DM, (—◇—) 153 °C; 2.8 mmol g<sup>-1</sup> DM, (—■—) 110 °C; 2.2 mmol g<sup>-1</sup> DM, (—●—) 160 °C; 2.2 mmol g<sup>-1</sup> DM, (—\*—) 135 °C; 3 mmol g<sup>-1</sup> DM, (—○—) 135 °C; 1.5 mmol g<sup>-1</sup> DM, central point (···●···) 135 °C; 2.2 mmol g<sup>-1</sup> DM.



**Figure 2.** Response surfaces generated by the ANOVA on the concentration of ( $\text{g L}^{-1}$ ): (A) glucose, (B) xylose; (C) arabinose, (D) acetic acid, (E) furfural, (F) HMF, and (G) soluble lignin in the hydrolysate of soybean hulls in 40 minutes of reaction, under different conditions of temperature and acid concentration. The clear portion of the graph shows higher concentrations of each component.



**Figure 3.** Response surface generated by the objective function. Points represents treatments under different temperatures and acid concentration.