



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**PRODUÇÃO DE ETANOL E HIDROLISADO PROTÉICO DA
CASCA DE SOJA**

Mayerlenis Jiménez Rojas

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Raquel de Lima Camargo Giordano – UFSCar

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli. – UFSCar

São Carlos

2012

Mayerlenis Jiménez Rojas

PRODUÇÃO DE ETANOL E HIDROLISADO PROTÉICO DA CASCA DE
SOJA

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Química da Universidade Federal de São
Carlos, como requisito para obtenção do
título de Mestre em Engenharia Química.

Área de Pesquisa: Engenharia Bioquímica

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Raquel de Lima Camargo Giordano – UFSCar

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli. – UFSCar

São Carlos

2012

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

R741pe

Rojas, Mayerlenis Jiménez.

Produção de etanol e hidrolisado protéico da casca de soja / Mayerlenis Jiménez Rojas. -- São Carlos : UFSCar, 2012.

93 f.

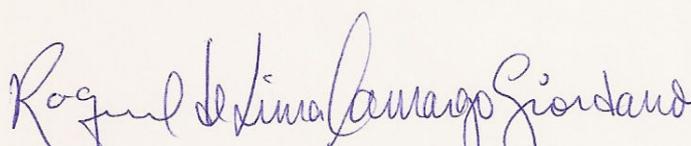
Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2012.

1. Engenharia bioquímica. 2. Hidrólise de celulose. 3. Hidrólise enzimática. 4. Distribuição de tamanho de peptídeos. I. Título.

CDD: 660.63 (20ª)

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE **MAYERLENIS JIMÉNEZ ROJAS** APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 10 DE AGOSTO DE 2012.

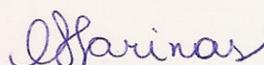
BANCA EXAMINADORA:



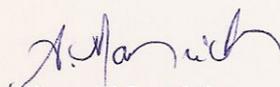
Raquel de Lima Camargo Giordano
Orientadora, PPGEQ/UFSCar



Paulo Wardir Tardioli
Co-orientador, PPGEQ/UFSCar



Cristiane Sanchez Farinas
Embrapa



Anny Manrich
Embrapa

DEDICATORIA

Dedico este trabalho a minha família, em especial a meus pais Liber e Rafael, a minha avó, Flor que moram no meu coração. A Andrés meu namorado por seu amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e as oportunidades.

A meus orientadores Raquel de Lima Camargo Giordano e Paulo Waldir Tardioli pela orientação, paciência, ajuda e ensinamentos.

Gostaria também de agradecer a todos meus colegas de laboratório por seu companheirismo, amizade e ajuda incondicional.

Aos professores do Departamento do DEQ que contribuíram na minha formação.

À Lucia Wolf pela ajuda nos inícios do trabalho.

Aos técnicos, Amadeus, Thais, Thiago e Aline pela ajuda prestada.

À Anp pelo apoio financeiro.

À empresa IMCOPA pelo fornecimento da casca de soja.

A meus pais pela confiança em minhas capacidades e por seu apoio para lograr uma meta mais na vida.

Ao Andrés pelo apoio, confiança e carinho que foram muito importantes neste tempo.

A todas as pessoas que contribuíram para a realização de este trabalho.

Cuando quieres alguna cosa,

TODO EL UNIVERSO CONSPIRA PARA QUE REALICES TU DESEO.

Paulo Coelho.

RESUMO

A casca de soja, sendo um resíduo lignocelulósico, contém celulose (38-51%) que pode ser convertida a etanol. Além disso, contém 9-14% de proteínas, que uma vez hidrolisadas por endoproteases podem liberar de forma específica oligopeptídeos com aplicações nutricionais. Ligações glicosídicas e peptídicas podem ser rompidas por hidrólise ácida, sendo hemicelulose mais susceptível a que celulose. O ataque ácido ao material permitiria assim reduzir o conteúdo de hemicelulose da biomassa, tornando a celulose que permanece na fração sólida insolúvel mais acessível às enzimas hidrolíticas. Neste trabalho, foram estudadas diferentes rotas de solubilização de proteínas, hemicelulose e lignina presentes na casca de soja, visando obtenção de etanol da fração sólida e oligopeptídeos na fração líquida. A recuperação de proteínas na forma de peptídeos foi feita hidrolisando-se a biomassa inicialmente com extrato comercial de endoprotease Novo-ProD® , a 60°C, pH 9, por 5h, nas concentrações enzimáticas de 1, 2 e 4% (m/m). Foi também testada, na sequência da hidrólise com Novo-ProD® 1%, nova hidrólise com quimotripsina 1% (m/m). Os resultados mostraram que a hidrólise proteolítica com 1% de Novo-ProD® permitiu remoção de 56,9% da proteína presente na casca. Contudo, foi também verificado que é possível remover 45,6% das proteínas nas mesmas condições, na ausência de enzima, a pH9,0, possivelmente devido à liberação de unidades agregadas apenas fisicamente. Um aumento da concentração de endoproteases de 1% para 2% elevou a remoção para 74% de proteínas, não se observando aumento significativo na extração de proteínas aumentando-se de 2 para 4%. Com uso da enzima mais específica, a quimotripsina, que opera em condições mais brandas, foi possível remover 44% das proteínas, com uma maior remoção de lignina do material, comparando-se com Novo-ProD®. Hidrólise ácida de casca *in natura* ou sequencial à hidrólise com Novo-ProD® 1% sequencial permitiu atingir uma remoção total de aproximadamente 90% de proteínas. O material sólido remanescente e a casca *in natura* foram submetidos à hidrólise ácida com H₂SO₄ 3% (v/v), razão 1:4 (sólido/líquido), 120°C, 20 min. Em todos os casos, as análises de carboidratos mostraram que foi possível remover aproximadamente 46,7% de hemicelulose, maior parte na forma de xilose. Durante o tratamento ácido ocorreu a remoção de quase toda a proteína da casca de soja, sem perda expressiva de celulose, o que se observou ocorrer na hidrólise ácida da casca *in natura*. Assim, seja para obter-se um hidrolisado proteico de composição controlada, seja para produção de etanol da fração sólida remanescente é recomendável a remoção enzimática prévia de proteínas. A composição química do material sólido após hidrólises proteolítica e ácida sequenciais mostrou teores de celulose similares para todas as amostras (aproximadamente 49 %). Assim, o sólido pré-tratado com 1% de Novo Pro-D, foi utilizado para a obtenção dos açúcares fermentescíveis usando o complexo enzimático Acellerase 1500 a 50°C, pH 4,8 e razão enzima/substrato de 7 FPU/g celulose durante 72 h. Nestas mesmas condições foram hidrolisadas as amostras de casca *in natura* pré-tratada com ácido, a casca *in natura* e a casca após hidrolise proteolítica. A conversão enzimática de celulose em glicose foi em torno de 40%, tanto para as amostras pré-tratadas com Novo-ProD como para a amostra submetida só a hidrólise ácida. Com um aumento de carga enzimática para 20 FPU/g celulose foi possível atingir uma conversão de 55% para amostras pré-tratadas com 1% de Novo-ProD® e hidrólise ácida sequenciais. A suplementação do complexo enzimático Acellerase 1500 com 120 UI de β-glicosidase e 1%(m/m) de pectinase não produziu aumento na conversão enzimática. A hidrólise da celulose proveniente de pré-tratado por organossolve usando etanol 50% a 170°C por 1 hora resultou em 52% de conversão com uma menor remoção de hemicelulose mostrando que a lignina estava causando o maior impedimento para o ataque enzimático. A conversão de glicose em etanol foi similar para as amostras pré-tratadas por hidrolise ácida e com as hidrólises proteolíticas (1% Novo-ProD®) e ácidas sequenciais chegando a uma concentração aproximada de 13 g/L.

Palavras chaves: Casca de soja, hidrolisados proteicos, etanol lignocelulósico.

ABSTRACT

Soybean hull is a lignocellulosic biomass that contains 38-51% of cellulose, which could be converted to ethanol. In addition, contains 9-14% of protein that can be hydrolyzed by endoproteases, releasing oligopeptides with nutritional applications. Although glycoside and peptide linkages can be hydrolyzed by acids, the cellulose molecules are more resistant than the protein and hemicellulose molecules. In this way, the acid treatment of the biomass would reduce its hemicellulose content, and the remnant cellulose into solid fraction would be more susceptible to hydrolytic enzymes. In this work, different routes of protein, hemicellulose, and lignin solubilization were evaluated, intending to obtain ethanol and soluble oligopeptides from the soybean hull. The protein was recovered as oligopeptides by hydrolysis of the lignocellulosic biomass using the commercial endoprotease Novo-Pro D® at 60°C, pH 9.0, 5 h, and different enzyme concentrations (1, 2, and 4%, m/m). A sequential hydrolysis using chymotrypsin and Novo-Pro D®, both at 1% (m/m) enzyme concentration, was also evaluated. The results showed that hydrolysis with 1% Novo-Pro D® allowed solubilization of 56.9% of protein from the soybean hulls. Nonetheless, at same temperature and pH, in absence of enzyme, was possible to solubilized 45.6% of the proteins. This solubilization is probably due to liberation of the physically aggregated units. The increase of endoprotease concentration from 1 to 2% increased the protein removal to 74%. However, the increase from 2 to 4% not increased significantly the protein solubilization. The use of chymotrypsin, an enzyme with high specificity and that work at mild conditions, allowed a solubilization of 44% protein. Nonetheless, the removal of lignin using chymotrypsin was higher than that using Novo-Pro D®. When in-nature soybean hull was hydrolyzed by acid or protease (1% Novo-Pro D®) followed by acid, the protein removal was around of 90%. The lignocellulosic biomass was hydrolyzed with 3% (v/v) H₂SO₄, solid:liquid ratio of 1:4, 120°C, and 20 min. Carbohydrate analyses showed that the acid treatment allowed to hemicellulose removal around of 46.7% in the xylose form. The protein content of the soybean hull was almost totally solubilized during the acid hydrolysis, without significant loss of cellulose. On the contrary, large cellulose loss was observed during the acid hydrolysis of in-nature soybean hull. In this way, if it is intended to produce a protein hydrolysate containing controlled composition or ethanol from remnant solid fraction, is strongly recommended the previous enzymatic solubilization of the proteins. The chemical composition of the solid biomass after sequential hydrolyses with protease and acid showed cellulose content around of 49% for all samples. So, the biomass treated with 1% (m/m) Novo-Pro D® was saccharified with Acellerase 1500 at 50°C, pH 4.8, and enzyme/substrate ratio of 7 FPU/g of cellulose for 72 h. Under the same conditions, soybean hull in-nature, pretreated with acid, and pretreated with protease were submitted to cellulolytic hydrolyses. The cellulose-to-glucose conversion was around of 40% for the last two biomass. The increase of the enzymatic load to 20 FPU/g of cellulose allowed a cellulose conversion of 55% for biomass pretreated with 1% (m/m) Novo-Pro D®, followed by acid hydrolysis. The supplementation of the Acellerase 1500 with 120 IU of β-glucosidase and 1% (m/m) of pectinase not produced any increased in the cellulose conversion. The biomass was pretreated by organosolv method (50% ethanol, 170°C, and 1h) and saccharified with Acellerase 1500 under the same conditions described above. This procedure yielded a cellulose conversion of 52%, with less removal of hemicellulose. This result showed that lignin was causing greater steric hindrances to the enzymatic attack. The biomass pretreated with acid and with protease (1% Novo-Pro D) followed by acid yielded the same glucose-to-ethanol conversion, reaching an ethanol concentration around of 13 g/L.

Keywords: Soybean hull, protein hydrolysate, lignocellulosic ethanol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Diagrama do processo de extração do óleo de soja.....	18
Figura 2.2 - Distribuição dos carboidratos, lignina e proteínas na parede vegetal.....	21
Figura 2.3 - Representação da molécula de celulose.....	22
Figura 2.4 - (A) Microfibrila de celulose, (B) Arranjo da fibrila elementar de celulose, (C) Rede conformada pelas ligações intra e intermoleculares.	23
Figura 2.5 - Estruturas químicas dos componentes da hemicelulose	24
Figura 2.6 - Estrutura dos alcoóis precursores da lignina.....	25
Figura 2.7 - Estrutura dos homogalacturonanos.....	27
Figura 2.8 - Reação de hidrólise da ligação peptídica.....	29
Figura 2.9 - Representação esquemática da proteólise seletiva do SPI nativo.....	34
Figura 2.10 - Modelo da parede celular que mostra o efeito geral do pH sobre a solubilização de hemicelulose e lignina	37
Figura 2.11 - Mecanismo proposto para amorfogenesida celulose / despolimerização por celulasas.....	41
Figura 2.12 - Os principais fatores que limitam a hidrólise da celulose e correspondentes estratégias ou métodos para minimizar suas influências	42
Figura 2.13 - Processo de fermentação ao nível celular.....	42
Figura 2.14 - Composição média da biomassa lignocelulósica e os principais produtos de hidrólise e compostos inibidores derivados dos pré-tratamentos	44
Figura 3.1 - Fluxograma da metodologia empregada para o estudo da casca de soja.....	54
Figura 4.2 - Valores percentuais dos componentes do complexo lignocelulósico remanescentes nas frações sólidas da casca de soja <i>in natura</i> e após diferentes tratamentos: a) <i>In natura</i> ; b) hidrólise proteolítica com 1% de Novo-ProD® com ajuste imediato de pH c) pH 9,0, 5h (branco); d) hidrólise proteolítica com 1% de Novo-ProD®; e) hidrólise proteolítica com 2% de Novo-ProD® ; f) hidrólise proteolítica com 4% de Novo-ProD®	69
Figura 4.3 – Valores percentuais dos componentes do complexo lignocelulósico remanescentes nas frações sólidas da casca de soja <i>in natura</i> e após diferentes tratamentos: a) <i>In natura</i> ; b) hidrólise proteolítica com 2% de Novo-ProD® c) as consecutivas usando 1% de quimotripsina (55°C, 5 h, pH 8,0) seguida da hidrolise com 1% de Novo-ProD® (60°C, 5 h, pH 9,0)	70
Figura 4.4 - Conversão de celulose em glicose em função do tempo para casca de soja <i>in natura</i> e submetida a diferentes pré-tratamentos, usando uma carga enzimática de 7 FPU por grama de celulose a 50°C, pH 4,8 por 72 horas.....	74

Figura 4.5 – Comparação dos perfis da conversão enzimática da celulose (%) com diferentes cargas de enzima 7 ou 20 FPU em relação ao tempo de hidrolise para amostras pré-tratadas com 1% de Novo-ProD® seguidas de hidrolise ácida suave.....	75
Figura 4.6 – Perfis da conversão enzimática da celulose (%) em relação ao tempo de hidrolise, suplementando o complexo enzimático Acellerase 1500 com β -glicosidade e pectinase usando como substrato amostras pré-tratadas com 1% de Novo-ProD® seguidas de hidrolise ácida suave.	76
Figura 4.7 – Comparação dos perfis da conversão enzimática da celulose (%) em relação ao tempo de hidrolise, das amostras pré-tratadas com 1% de Novo-ProD® seguidas de hidrolise ácida suave e organossolve.	77
Figura 4.8 – Conversão enzimática da celulose (%) em relação ao tempo de hidrolise, com diferentes umidades iniciais das amostras pré-tratadas com 1% de Novo-ProD® seguidas de hidrolise por organossolve.	78
Figura 4.9 – Perfis da etapa de fermentação para os hidrolisados contidos na tabela 4.11.	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Composição química da casca da soja.....	19
Tabela 2.2 - Composição química de materiais lignocelulósicos representativos	21
Tabela 2.3 - Pré-tratamentos realizados para a obtenção de etanol da casca de soja	38
Tabela 2.4 - Comparação entre os principais processos de fermentação.....	44
Tabela 3.1 - Padrões utilizados para a determinação do perfil peptídico das proteínas hidrolisadas em casca de soja.....	52
Tabela 4.1 - Composição química percentual determinada para a casca de soja neste e em outros trabalhos reportados na literatura (MIELENZ, <i>et al.</i> , 2009) e (CASSALES, <i>et al.</i> , 2011)	60
Tabela 4.2 – Percentuais mássicos de proteína de casca de soja encontrada na fração líquida após contato da casca com água a 60°C, com e sem adição de enzima (a pH 9,0) em relação ao máximo teórico (solubilização de toda as proteínas presentes na casca).....	62
Tabela 4.3a – Composição por faixa molecular das proteínas encontrada na fração líquida após contato da casca com água a 60°C, pH 5,6 e a pH9,0, inicial e após 5 horas com e sem adição de enzima (branco).....	65
Tabela 4.3b – Massas extraídas (g) nas diferentes faixas de massa molecular das proteínas encontradas na fração líquida após contato da casca com água a 60°C, pH 5,6 e a pH9,0, inicial e após 5 horas com e sem adição de enzima (branco).	65
Tabela 4.4 – Teores percentuais de proteína, celulose, hemicelulose e lignina na casca de soja in natura e nas frações sólidas após extração com e sem adição de proteases.....	67
Tabela 4.5 - Rendimentos mássicos* (η) após extração de proteínas com e sem adição de proteases e teores percentuais de cada componente, corrigidos levando-se em conta os rendimentos (massa de sólido após extração/massa inicial submetida à extração).....	67
Tabela 4.6 - Composição química da casca de soja in natura e das frações sólidas obtidas após extração de proteínas com diferentes concentrações de catalisador Novo-ProD®	68
Tabela 4.7 - Rendimentos mássicos* (η) após extração de proteínas com e sem adição de proteases e composição químicas percentuais calculadas relativas à massa inicial submetida à extração.....	68
Tabela 4.8 - Composições químicas percentuais das frações sólidas da casca de soja após hidrólise ácida seqüencial às hidrólises protéicas e diretamente da casca in natura.....	72
Tabela 4.9 -.Rendimentos mássicos* (η) e composições percentuais corrigidos da casca de soja após hidrólise ácida da biomassa in natura e de biomassas submetidas previamente à hidrólise protéica com diferentes concentrações de enzima. Composições químicas percentuais calculadas relativas à massa submetida à extração ácida	72
Tabela 4.10 - Composições químicas das frações líquidas obtidas após hidrólise ácida de casca de soja in natura e após ser submetida a hidrólise enzimática com diferentes concentrações de Novo-ProD®.	72

Tabela 4.11 – Concentrações de glicose (C_g) e de etanol (C_{et}), conversão, produtividade e rendimento em etanol em 72 h no processo de hidrólise e fermentação por *S.cerevisiae*, para diferentes condições de pré-tratamento da casca de soja..ocesso fermentativo. $X_{c/g}$ = conversão celulose/glicose; Pr_g = produtividade em glicose; $X_{g/et}$ = conversão glicose/etanol; Pr_{et} = produtividade em etanol; n_{et} = rendimento em etano em relação ao teórico 79

Tabela 4.12 – Conversão de celulose a glicose e concentração de glicose no hidrolisado em função do tempo para os materiais pré-tratados com 1% Novo Pro-D® seguida de H. Ácida (3% H_2SO_4) e da casca de soja *In Natura* hidrolisadas com diferentes cargas enzimáticas. $X_{c/g}$ = conversão celulose/glicose; Pr_g = produtividade em glicose..... 80

Tabela 4.13a – Concentração de glicose, de etanol, conversão glicose-etanol, rendimento em etanol ($C_{etanol}/$ glicose consumida), produtividade em etanol ($C_{etanol}/$ tempo), rendimento em relação ao teórico ($rend/0,511$) e produtividade, em função do tempo para o hidrolisado [a]. $X_{g/et}$ = conversão glicose/etanol; Pr_{et} = produtividade em etanol..... 80

Tabela 4.13b – Concentração de glicose, de etanol, conversão glicose-etanol, rendimento em etanol ($C_{etanol}/$ glicose consumida), produtividade em etanol ($C_{etanol}/$ tempo), rendimento em relação ao teórico ($rend/0,511$) e produtividade, em função do tempo para o hidrolisado [b]. $X_{g/et}$ = conversão glicose/etanol; Pr_{et} = produtividade em etanol..... 80

Tabela 4.13c – Concentração de glicose, de etanol, conversão glicose-etanol, rendimento em etanol ($C_{etanol}/$ glicose consumida), produtividade em etanol ($C_{etanol}/$ tempo), rendimento em relação ao teórico ($rend/0,511$) e produtividade, em função do tempo para o hidrolisado [c]. $X_{g/et}$ = conversão glicose/etanol; Pr_{et} = produtividade em etanol 81

Tabela 4.13d – Concentração de glicose, de etanol, conversão glicose-etanol, rendimento em etanol ($C_{etanol}/$ glicose consumida), produtividade em etanol ($C_{etanol}/$ tempo), rendimento em relação ao teórico ($rend/0,511$) e produtividade, em função do tempo para um meio de cultivo controle com glicose (20 g/L) e demais nutrientes adicionados aos hidrolisados. $X_{g/et}$ = conversão glicose/etanol; Pr_{et} = produtividade em etanol 81

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 Considerações gerais sobre a soja	16
2.2 Processamento industrial da soja	17
2.3 A Casca de Soja	18
2.3.1 Processamento industrial da casca de soja.....	20
2.4 Complexo lignocelulósico	20
2.4.1 Celulose.....	22
2.4.2 Hemicelulose.....	23
2.4.3 Lignina	24
2.4.4 Extrativos e Cinzas.....	25
2.4.5 Proteínas.....	26
2.4.6 Pectinas	27
2.5 Enzimas	27
2.5.1 Hidrolases	28
2.5.1.1 Proteases.....	29
2.5.1.2 Enzimas Celulolíticas.....	30
2.6 Hidrólise Enzimática de Proteínas	31
2.7 Pré-tratamentos	34
2.7.1 Pré-tratamentos físicos	36
2.7.2 Pré-tratamentos biológicos.....	36
2.7.3 Pré-tratamentos químicos	36
2.8 Hidrólise de celulose	39
2.9 Fermentação alcoólica de glicose	42
3. MATERIAL E MÉTODOS	45

3.1 Material	45
3.2 Métodos	46
3.2.1 Determinação do teor de Umidade.....	46
3.2.2 - Caracterização Química da Biomassa Lignocelulósica	46
3.2.3 Determinação do teor de proteínas	50
3.2.4 – Determinação do tamanho dos peptídeos	52
3.2.5 Tratamento da casca de soja – Hidrólise proteolítica, remoção de hemicelulose, hidrólise celulolítica e fermentação alcoólica.....	53
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
4.1. Caracterização química da biomassa lignocelulósica	60
4.2. Remoção enzimática de proteínas da casca de soja.....	61
4.2.1 Hidrólises alcalina e enzimática com 1% Novo-ProD®	62
4.2.3 Hidrólise enzimática usando Quimotripsina.....	69
4.3. Efeito da hidrólise ácida branda na remoção de componentes da casca de soja	71
4.4. Hidrólise enzimática da celulose e Fermentação	73
5 CONCLUSÕES	83
REFERENCIAS.....	85

1 INTRODUÇÃO

A biomassa lignocelulósica é formada principalmente por celulose, hemicelulose e lignina. A celulose é um polímero de glicose constituído por regiões amorfas e cristalinas de difícil acesso às enzimas. Por outro lado, a hemicelulose se caracteriza por ser um heteropolímero amorfo constituído por diferentes açúcares de cinco e seis carbonos sendo mais facilmente hidrolisável em pH ácidos. A lignina é uma macromolécula apolar que tem como função proteger os outros materiais da degradação (ZHANG *et al.*, 2011). São fontes de biomassa os resíduos florestais como madeira, resíduos de cultivos como bagaço de cana, sabugo e palha de milho, palha de trigo e co-produtos agrícolas como a casca de soja e o farelo de trigo (YOO, 2007). Dentre os resíduos lignocelulósicos mais abundantes da agroindústria brasileira, destaca-se a casca de soja, uma vez que o Brasil é o segundo maior produtor mundial do grão. Na safra 2010/2011, a produção brasileira ficou em torno de 69,2 milhões de toneladas (CONAB, 2012), gerando aproximadamente 5,54 milhões de toneladas de casca.

A composição química da casca da soja (CS) varia em função da eficiência no processo da sua extração. Por exemplo, durante a produção de farelo com maior concentração de proteína, a retirada da casca da soja é feita com maior intensidade, não havendo contaminação desta por pedaços do grão ou pelo farelo. Assim, a CS pode conter, 29-51% de celulose, 10-20% de hemicelulose, 1-4% de lignina e 9-14% de proteínas (MIELENZ, *et al.*, 2009; YOO, *et al.*, 2011).

Devido ao baixo conteúdo de lignina e alto conteúdo de celulose, a casca de soja representa uma fonte atrativa de açúcares fermentáveis para produção de etanol de segunda geração. O etanol é hoje o combustível renovável mais importante em termos de volume e valor de mercado. Atualmente, a maior parte é produzida a partir de açúcar e de amido, usando como matérias primas a cana de açúcar e o milho (TAHERZADEH; KARIMI, 2008). O Brasil ocupa a segunda posição mundial na produção, com 28 milhões de m³ de etanol na safra 2010/2011. Nesse cenário, a produção de etanol a partir de resíduos lignocelulósicos agroindustriais vem despertando grande interesse devido à possibilidade de elevar a produção sem aumento da área de cana plantada. Os resíduos lignocelulósicos são atrativos para essa aplicação devido ao baixo custo, abundância e alto conteúdo de carboidratos presentes na matriz (MIELENZ, 2001)

Devido à recalcitrância desse substrato, sua bioconversão a etanol requer um pré-tratamento termoquímico prévio para facilitar a hidrólise enzimática dos complexos de carboidratos a açúcares simples que podem ser fermentados a etanol. As investigações atuais indicam que os processos de pré-tratamento e outros aspectos da produção de etanol celulósico elevam os custos de produção dificultando a concorrência no mercado (GALBE *et al.*, 2007; MIELENZ, 2001; MIELENZ, *et al.*, 2009). Porém, a casca da soja apresenta um atrativo adicional para utilização como matéria-prima industrial: seu teor de proteínas. Essa característica tem proporcionado a comercialização fins de nutrição como ração animal. Ademais, a recuperação de proteínas da casca na forma de hidrolisados ricos em peptídeos pode contribuir para a valorização desse subproduto. Tais proteínas podem ser hidrolisadas via rota química ou enzimática, destacando-se a segunda por ser mais específica e evitar a degradação de aminoácidos diminuindo o valor nutricional do produto final. A hidrólise enzimática de proteínas tem sido utilizada na indústria de alimentos e ração por promover melhorias nas propriedades antialérgicas e funcionais como aumento de solubilidade, poder emulsificante e valor nutritivo (BIASUTTI, 2006).

O grupo de pesquisa em Engenharia Bioquímica do DEQ/UFSCar vem desenvolvendo trabalhos em parceria com a empresa IMCOPA (Araraucaria, PR) visando o aproveitamento de subprodutos do processamento da soja. Nesse contexto, tem sido recuperadas lecitina e isoflavonas a partir do melaço de soja e peptídeos a partir da hidrólise enzimática de proteínas do farelo de soja. O atual trabalho faz parte da cooperação IMCOPA-DEQ/UFSCar e engloba duas vertentes que conduzem ao melhor aproveitamento da casca de soja: o estudo da rota enzimática para produção de etanol celulósico e recuperação de proteínas presentes no material.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Considerações gerais sobre a soja

A soja é considerada uma leguminosa originária da China, cultivada há mais de cinco mil anos. No início do século XX, começou a produção de soja nas Américas, sendo atualmente cultivada nos Estados Unidos, Brasil e Argentina, que juntos produzem aproximadamente 85% da soja do mundo (CHAVEZ *et al.*, 2010; BULHÕES, 2007;).

Em 1882, a soja chegou ao Brasil via Estados Unidos. No final de 1960, sofreu uma grande expansão graças às vantagens e os créditos (redução de preços para o plantio e a conservação da soja) oferecidos pelo governo brasileiro para os produtores. O crescimento dos rebanhos bovinos na Europa Ocidental e Estados Unidos, no início de 1970 produziu um aumento na demanda por soja, sendo utilizada inclusive para a fabricação de rações. Assim, no decorrer de 1970, os plantios da soja e da cana-de-açúcar sofreram rápidas e profundas transformações, por se tratarem de culturas de tipo exportação. No ano de 1987 a produção brasileira de soja era de 14 mil toneladas anuais, e para o ano 2003, o Brasil figura como o segundo produtor mundial, responsável por 52 das 194 milhões de toneladas produzidas em nível global ou que equivale a 26,8% da safra mundial (CNPSO, EMBRAPA).

Na safra 2010/11, a cultura ocupou uma área de 24,2 milhões de hectares, o que totalizou uma produção de 75,0 milhões de toneladas. Os Estados Unidos, maior produtor mundial do grão, responderam pela produção de 90,6 milhões de toneladas de soja. A produtividade média da soja brasileira é de 3.106 Kg por hectares, chegando alcançar cerca de 3.190 Kg/ha no estado de Mato Grosso, o maior produtor brasileiro de soja (CONAB).

Entre as espécies de leguminosas, a soja destaca-se por conter o mais alto teor de proteínas (acima de 40%). Outras leguminosas, por exemplo, canola, têm teores de proteínas entre 20% e 30%. Neste grão também são encontrados outros componentes fundamentais que incluem fosfolipídios, vitaminas, saponinas e isoflavonas; por isso, a soja se torna atualmente um alimento funcional, já que contribui na melhoria da saúde e na qualidade de vida (FISHER, 2006). No entanto,

os derivados da soja também são amplamente utilizados para a alimentação animal, principalmente como fonte de fibras e proteínas.

Além dessas múltiplas utilidades, o grão da soja é atualmente usado como fonte de bioenergia para a produção de biocombustíveis (biodiesel e etanol), pois reduz a emissão poluente e constitui uma fonte de produção renovável (BULHOES, 2007).

2.2 Processamento industrial da soja

O grão de soja é usualmente utilizado para a obtenção do óleo e farelo de soja, numa proporção de 20 e 80%, respectivamente, num processo de extração por solvente (ERICKSON *et al*, 1992).

O farelo de soja é usado em sua maioria como fonte de proteínas na ração animal, principalmente para alimentação de suínos e aves. Esse farelo é torrado/aquecido ao ponto de inativar os fatores antinutricionais naturalmente presentes na soja (inibidor de tripsina, estaquiose, rafinose, fitato) (OTTO, 2009).

O processamento industrial da soja se inicia basicamente com a descarga e armazenagem dos grãos, onde a soja recebida é removida dos caminhões mediante um tombador e armazenada em uma moega de recepção. Posteriormente, os grãos da soja são transferidos para um silo pulmão, onde são conduzidos a uma seção de pré-limpeza, para remover as impurezas graúdas e médias para evitar que se queimem no processo de secagem, onde as máquinas classificam granulometricamente os materiais através da diferença de tamanhos, efeito vibratório e aspiração pneumática.

Depois, os grãos isentos de impurezas passam por uma etapa de secagem antes de serem transferidos aos silos de estocagem, onde os grãos são armazenados em condições de temperatura ambiente e com umidade controlada. Assim, a soja vinda dos silos pode ser: a) seca e aquecida e seguidamente descascada para obter-se farelo de alto teor de proteína, ou b) diretamente enviada à preparação. Nesta seção, a soja é pesada e limpa usando separadores gravimétricos e peneiras. A remoção das partículas metálicas é feita através de separador magnético (DORSA, 2000).

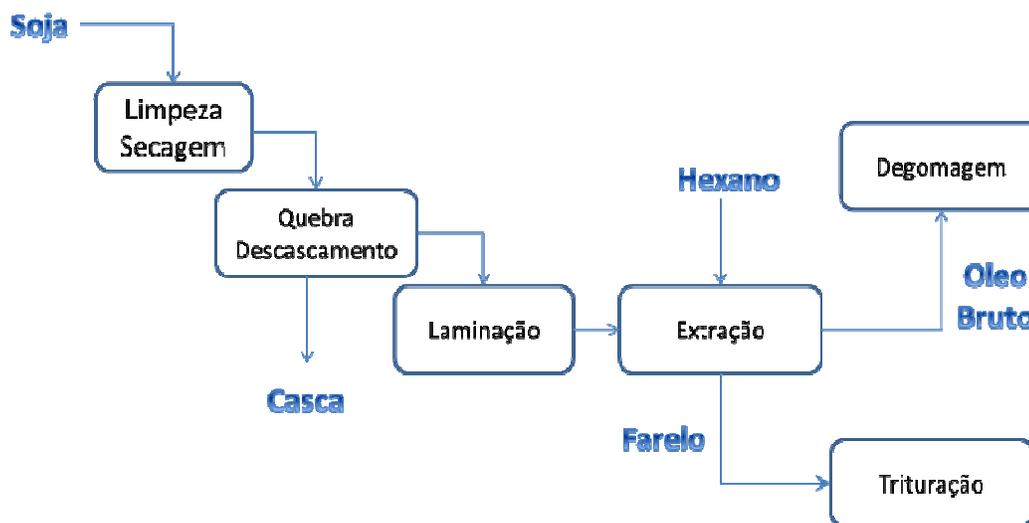
No processo de extração, o óleo é extraído do grão da soja previamente laminado em um extrator contínuo, usando como solvente o hexano. A

mistura de óleo e solvente é conduzida a um sistema de evaporação e condensação para se retornar o solvente novamente ao processo, deixando o óleo totalmente livre do mesmo. A fração sólida (farelo) com solvente passa por uma etapa de dessolventização na qual o solvente é removido do farelo. Durante a etapa de tostagem, é dispensável controlar o índice de proteína, pois é nela onde se desativam, mediante temperaturas controladas, as enzimas que não são assimiláveis pelos animais.

Posteriormente, o farelo dessolventizado é submetido a um processo de secagem e resfriamento e conduzido para a seção de moagem. Finalmente, o farelo é estocado em silos onde é ensacado.

O óleo bruto proveniente da extração passa por uma etapa de degomagem que é feita misturado o óleo com água quente para flocular os fosfatídeos (lecitina), que são seguidamente retirados em uma centrífuga; o óleo é transferido a uma seção de secagem e resfriado, e por último enviado ao tanque de estocagem (OTTO, 2009; DORSA, 2000,). A Figura 2.1 mostra o diagrama do processo de extração do óleo de soja.

Figura 2.1 - Diagrama do processo de extração do óleo de soja



Fonte: Adaptado de CAVALETT, 2008

2.3 A Casca de Soja

A casca de soja (CS) é o principal subproduto da indústria processadora de soja, principalmente da produção de óleo de soja, lecitina e outros

produtos de alto teor proteico. A CS corresponde a cerca de 8 a 10% do peso do grão inteiro (GNANASAMBANDAM; PROCTOR, 1999), sendo obtida em uma das primeiras etapas do processamento, quando os grãos são quebrados e as cascas retiradas por aspiração (SANTOS, 2008)

O processo de separação da casca de soja é feito basicamente para aumentar a porcentagem de proteínas no farelo, obtendo um teor de 48 a 50% de proteína bruta (PB) neste produto, ao invés de farelos com 42 a 45% de PB, (TURINO, 2003; FERREIRA, 2008).

A composição química da casca da soja varia em função da eficiência do processo de extração, pois quando se necessita de farelo com maior concentração de proteína, a retirada da casca da soja é feita com maior intensidade, não havendo então contaminação desta por pedaços do grão ou pelo farelo. A Tabela 1 apresenta a composição da casca de soja publicada por Cassales *et al*, (2011) e Mielenz *et al* (2009).

Tabela 2.1 - Composição química da casca da soja

Componente	Concentração(% m/m, base seca)	
	Mielenz <i>et al</i> , (2009)	Cassales <i>et al</i> , (2011)
Celulose	29-51%	31%
Hemicelulose	10-20%	26 %
Lignina solúvel em ácido	2,8%*	5,7%
Lignina insolúvel	ND	3,4%
Extrativos	ND	3,2%
Cinzas	1-4%	0,6%
Proteínas	9-14%	13,1%
Pectinas	6-15%	-

Adaptada de CASSALES *et al*, (2011) ; MIELENZ *et al* (2009).

Atualmente, a casca de soja é considerada um suplemento energético, pois seu fornecimento aos ruminantes permite desempenho comparável ao do milho, devido à alta digestibilidade da parede celular, composta basicamente por celulose (SANTOS, 2008).

Devido ao seu baixo conteúdo de lignina e seu alto conteúdo de celulose, a casca de soja é uma fonte atrativa de açúcares fermentescíveis para produção de etanol de segunda geração. A bioconversão dessa biomassa a etanol requer pré-tratamento termoquímico para facilitar a hidrólise enzimática dos complexos de carboidratos a açúcares simples que podem ser fermentados a etanol (MIELENZ, 2001; MIELENZ, *et al.*, 2009)

2.3.1 Processamento industrial da casca de soja

Para comercialização, a casca de soja passa previamente por um processamento industrial que se inicia com uma etapa de pré-limpeza (esta etapa é feita por peneiramento para separar as partículas finas e o material estranho) e quebra dos grãos para a obtenção do subproduto. Após a separação da casca do grão, este resíduo e parte das partículas passam por outro separador, cuja função é dividir-as em três categorias: cascas grandes e com pedaços de grãos, pequenas com pedaços de grãos e partículas finas. Essas últimas são retornadas à etapa inicial de pré-limpeza, enquanto as frações restantes de cascas e pedaços de grãos continuam para uma segunda etapa de descascamento que permite a separação total dos grãos, sendo encaminhadas posteriormente para um processo de tostagem para eliminar a atividade de urease, e por último, as cascas são moídas até o tamanho de partículas desejado, o que permite sua comercialização em forma solta ou peletizadas para ser usada como ração animal (BLASI et al, 2000).

2.4 Complexo lignocelulósico

Os materiais lignocelulósicos são os recursos renováveis mais amplamente disponíveis e de baixo custo do mundo que constituem uma fonte atrativa para a produção de etanol e outros compostos químicos. Entre as principais fontes desta biomassa encontramos: resíduos de floresta, como madeira, resíduos agrícolas, como bagaço de cana, sabugo de milho e palha de cana, sorgo, trigo e arroz, e subprodutos agrícolas, como casca de soja e farelo de trigo (YOO, 2011).

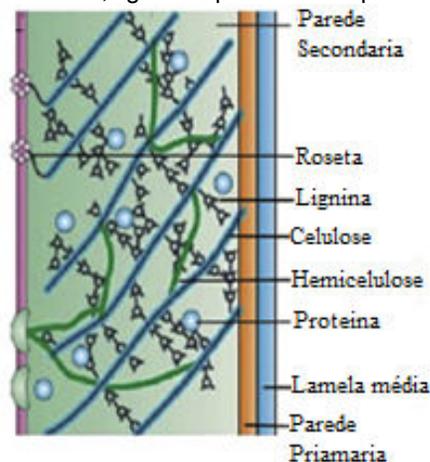
A biomassa lignocelulósica é constituída basicamente de 40 a 50% de celulose, 25 a 30% de hemicelulose, 15 a 20% de lignina, 5% de extrativos e vários compostos orgânicos, entre os quais se encontram as proteínas e pectinas (LIMAYEM; RICKE, 2012). A Tabela 2.2 lista as composições químicas de vários materiais lignocelulósicos.

Tabela 2.2 - Composição química de materiais lignocelulósicos representativos

Material Lignocelulósico	Composição química (base seca)		
	%Celulose	%Hemicelulose	%Lignina
Madeiras duras	40–55	24–40	18–25
Sementes de algodão	80–95	5–20	0
Bagaço de cana	25-45	28-32	15-25
Casca de arroz	29-36	12-29	15-20
Polpa do café	34-37	44-48	16-19
Palha de cevada	36-43	24-34	3-10
Sabugo de milho	32-46	~ 40	7-14
Casca de soja	29-51	10-20	2-8

Fonte: MENON *et al*, 2012.

No complexo lignocelulósico a estrutura da celulose permite a formação de ligações de hidrogênio intramoleculares e intermoleculares, gerando regiões cristalinas rígidas e organizadas, chamadas "microfibrilas elementares". Estas fibrilas estão ligadas umas a outras por uma matriz de hemicelulose (polímero amorfo de açúcares diferentes), bem como outros polímeros, tais como a pectina e cobertas por lignina, formando uma estrutura complexa, resistente aos tratamentos biológicos e químicos (HA *et al.*, 1998; TAHERZADEH; KARIMI, 2008). A Figura 2.2 apresenta a distribuição destes componentes na parede vegetal.

Figura 2.2 - Distribuição dos carboidratos, lignina e proteínas na parede vegetal

Fonte: MENON *et al*, 2012

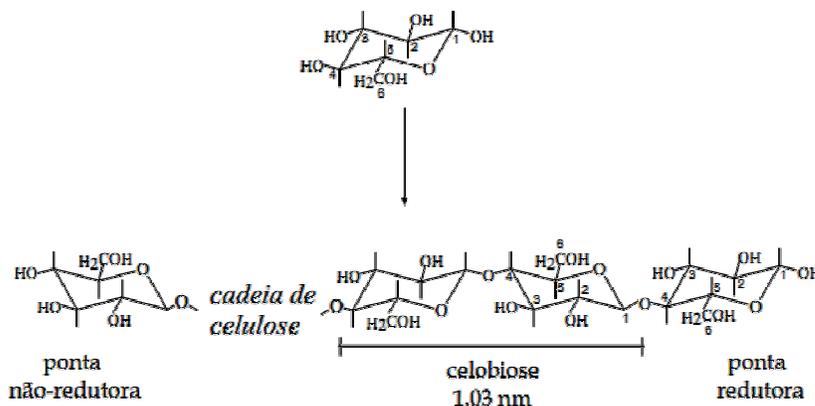
Para maior esclarecimento, na sequência serão descritas as funções e estruturas detalhadas de cada um dos componentes que constituem o complexo lignocelulósico.

2.4.1 Celulose

A celulose ((C₆H₁₀O₅)_n) é o principal componente encontrado na parede celular vegetal, sendo um homopolissacarídeo linear constituído por uma cadeia longa de monômeros de glicose unidas mediante ligações glicosídicas β (1→4), sendo a celobiose(dímero de glicose) sua unidade repetitiva (HA, *et al.*, 1998; TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

Os grupos funcionais na cadeia de celulose são os grupos hidroxilas (-OH). Estes grupos tornam à superfície da celulose altamente hidrofílica. A cadeia de celulose possui grupos -OH em ambas as extremidades, assim o C₁ tem propriedades redutoras (HETTI, 2004), como se mostra na Figura 2.3.

Figura 2.3 - Representação da molécula de celulose.



Fonte: FENGEL; WENEGER, 1989.

Sua estrutura completamente linear possui uma forte tendência para formar ligações de hidrogênio intramoleculares (entre grupos hidroxila da mesma molécula) e intermoleculares (entre grupos hidroxilas de cadeias adjacentes), levando à formação de uma estrutura cristalina resistente (microfibrilas), como se mostra na Figura 2.4. (HA, *et al.*, 1998; TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

Figura 2.4 - (A) Microfibrila de celulose, (B) Arranjo da fibrila elementar de celulose, (C) Rede conformada pelas ligações intra e intermoleculares.



Fonte: HIMMEL et al, 2007.

Na figura 2.4b é mostrada a constituição da fibra elementar de celulose constituída por cadeias de celulose contendo três grupos de: (vermelho) seis cadeias totalmente cristalinas, (verde) 12 cadeias subcristalinas que apresentam um pequeno grau de desordem e grupo C3 é constituído por 18 cadeias de celulose que apresentam um maior grau de desordem. A figura 2.4c representa as cores vermelhas representam as ligações de hidrogênio intra e intermoleculares.

Como resultado do arranjo das cadeias de celulose nas microfibrilas, estas possuem regiões cristalinas e amorfas, sendo que a maior parte da celulose está na forma cristalina. Conseqüentemente, as celulasas (enzimas hidrolíticas) hidrolisam mais facilmente a porção amorfa de celulose que é mais acessível, enquanto que a região cristalina é mais resistente à hidrólise enzimática (TAHERZADEH; KARIMI 2008).

A celulose está disponível em correntes de resíduos na forma de lignocelulósicos, ou parcialmente purificada na forma de papéis ou celulose pura, tais como algodão, ou misturado com outros materiais, por exemplo, nos resíduos cítricos.

2.4.2 Hemicelulose

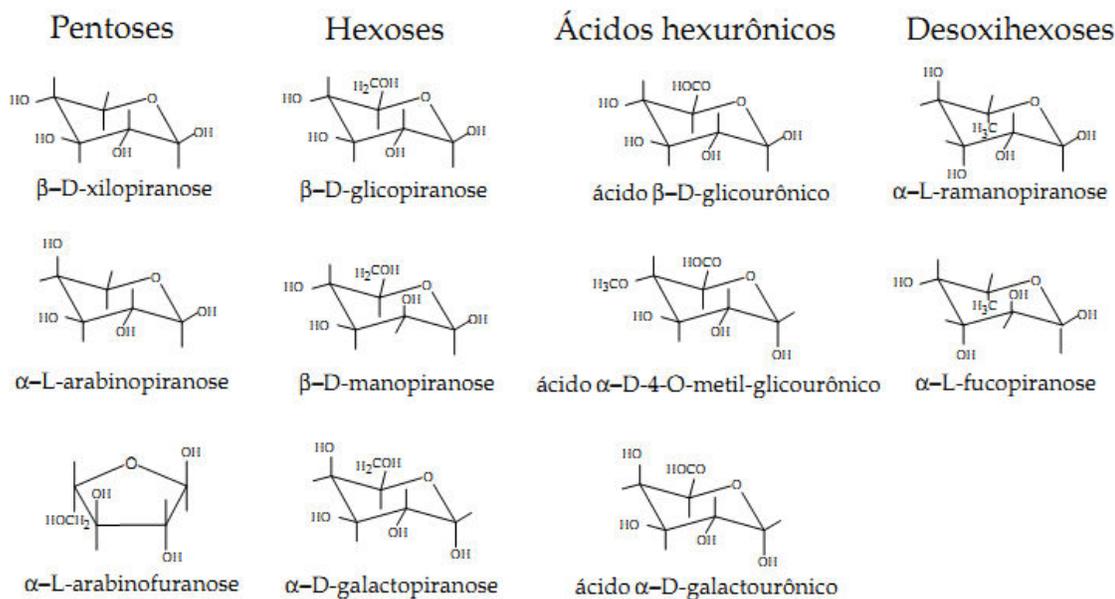
Hemicelulose, segundo polissacarídeo mais comum na natureza, é um heteropolímero formado por uma estrutura amorfa e variável de hexoses (D-glucose, D-galactose e D-manose), pentoses (D-xilose e L-arabinose) e ácidos urônicos (ácido D-glucurônico, ácido D-galacturônico e ácido metil galacturônico)

(MENON;RAO, 2012). Na Figura 2.5 são mostradas as estruturas químicas destes componentes.

Sua cadeia linear principal (espinha dorsal) é composta principalmente de xilana, constituída pela condensação de 90% de D-xilose e aproximadamente 10% de L-arabinose, unidas entre si mediante ligações β (1 \rightarrow 4)-.Suas ramificações podem variar dependendo da natureza e da fonte de matérias-primas(LIMAYEM; RICKE, 2012).

Estes polissacarídeos estão ligados entre si através de ligações covalentes e ligações de hidrogênio, como também podem estar associados quimicamente à lignina ou às proteínas mediante ligações cruzadas(VAN ZYL, *et al.*, 2011).

Figura 2.5 - Estruturas químicas dos componentes da hemicelulose



Fonte: FENGEL; WENEGER, 1989

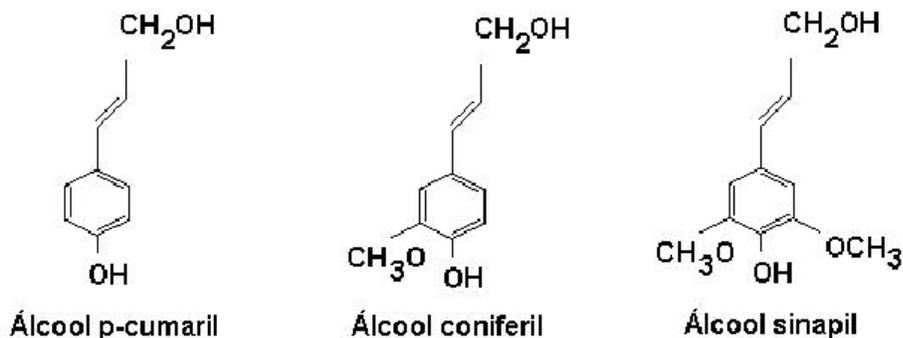
Em contraste com a celulose, que possui uma estrutura cristalina e resistente, a hemicelulose tem uma forma aleatória, amorfa e estrutura ramificada pouco resistência à hidrólise, sendo mais facilmente hidrolisadas a seus componentes monoméricos na presença de ácidos(TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

2.4.3 Lignina

A lignina é um dos principais componentes da biomassa vegetal; possui natureza aromática, hidrofóbica e muito complexa, formada por unidades de fenilpropano, as quais são derivadas da polimerização oxidativa de três alcoóis precursores (Figura 2.6):álcool trans-coniferílico, álcool trans-p-cumarílico e álcool trans-sinapílico (CURVELO 1992, HETTI 2004).

Esta macromolécula aromática possui um peso molecular de 10.000 Da e se encontra ligado através de ligações covalentes às xilanas (polímeros de hemicelulose), atribuindo um alto grau de rigidez e compactação à parede celular vegetal (LIMAYEM; RICKE, 2012).

Figura 2.6 - Estrutura dos alcoóis precursores da lignina



Fonte: THEANDER *et al* 1993.

A lignina é o componente mais recalcitrante da parede celular vegetal, e quanto maior a proporção de lignina, maior a resistência à degradação química e enzimática. Sua função na parede celular vegetal é servir como o principal sistema de defesa da planta a microrganismos patogênicos e insetos (TAHERZADEH; KARIMI, 2008; LIMAYEM; RICKE, 2012).

2.4.4 Extrativos e Cinzas

Junto aos componentes da parede celular encontram-se numerosas substâncias de baixo peso molecular que possuem diferentes composições químicas, chamadas extrativos, já que podem ser extraídos em água ou em solventes orgânicos.

Os extrativos mais comuns encontrados nos vegetais são: ácidos graxos, ceras, terpenos, óleos essenciais, compostos aromáticos (aldeídos, ácidos, álcoois, flavonoides, quinonas e taninos) e sacarose residual (WOLF, 2011).

As cinzas são compostos inorgânicos que desempenham um importante papel no metabolismo das plantas. São constituídas basicamente por cálcio, potássio, manganês, sulfatos, carbonatos e silicatos (CURVELO, 1992).

Estes componentes representam aproximadamente entre 5-20% de todo o material lignocelulósico, e varia dependendo de cada espécie (FENGEL; WEGENER, 1989).

2.4.5 Proteínas

A parede celular vegetal contém proteínas estruturais que realizam um papel importante na arquitetura da parede por meio de ligações cruzadas com outros componentes. Dentre elas, a proteína melhor descrita é a extensina, que constitui aproximadamente 5% da camada primária dos vegetais dicotiledônios. É uma glicoproteína constituída de cerca de 40% de hidroxiprolina e outros aminoácidos, lisina, serina e tirosina. Este último está envolvido em ligações cruzadas com compostos fenólicos, contribuindo para a insolubilidade da proteína na parede (DA-SILVA *et al*, 1997; WALDRON *et al*, 2003).

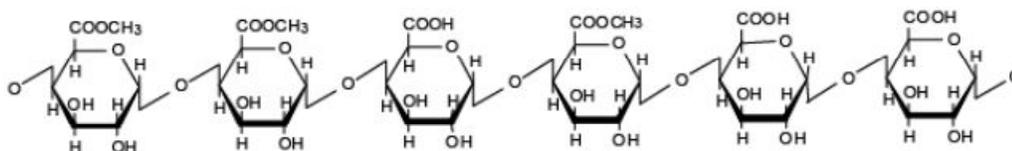
As proteínas encontradas na parede celular podem ser divididas em três classes estruturais. Na primeira classe encontram-se as extensinas, glicoproteínas básicas ricas em hidroxiprolina, serina, tirosina e lisina. Na segunda classe estão as proteínas ricas em glicinas que são caracterizadas pela repetitividade Gly-X, em que X frequentemente é glicina. E por último encontram-se proteínas ricas em prolina e hidroxiprolina que contêm unidades repetidas de Pro-Pro-Val-X-Lys, em que X frequentemente é histidina, tirosina ou glicina (SEIBEL e BELEIA, 2008)

A proteína da casca da soja, assim como a do farelo de soja, é uma fonte rica de lisina (0,71 a 0,72% em base seca). No entanto, esta apresenta baixas concentrações de metionina e cistina (0,30 a 0,33%, base seca) (CUNNINGHAM, *et al.*, 1993)

2.4.6 Pectinas

As pectinas são os principais componentes da lamela média e um dos principais polímeros da parede celular vegetal. São constituídas basicamente de ácido D-galacturônico, arabinose, ramnose e galactose. Este carboidrato complexo pode ser dividido em três grandes grupos: homogalacturonanos (Figura 2.7), ramnogalacturonanos e xilogalacturonanos. O primeiro deles possui uma espinha dorsal constituída por ácidos galacturônicos unidos entre si por ligações glicosídicas α -1-4. A massa molecular das pectinas pode variar de 50.000 a 150.000 Da, dependendo do tipo de extração e do material de origem (MONSOOR; PROCTOR, 2001; SEIBEL, 2008; GUILLOTIN, 2005).

Figura 2.7 - Estrutura dos homogalacturonanos



Fonte: GUILLOTIN, 2005

As pectinas estão ligadas às hemiceluloses mediante ligações cruzadas, formando uma rede tridimensional (gel hidratado) que une em conjunto aos componentes da parede celular, proporcionando rigidez à estrutura primária dos vegetais. Esta formação de gel é causada por ligações de hidrogênio entre grupos carboxilas livres das moléculas de pectina com os outros grupos hidroxilas das moléculas adjacentes (GUILLOTIN, 2005).

2.5 Enzimas

As enzimas são catalisadores biológicos, constituídos por longas cadeias de moléculas pequenas chamadas aminoácidos que se encontram unidos por ligações peptídicas covalentes. Portanto, quimicamente, a maioria das enzimas são proteínas com atividade catalítica, com exceção de um grupo de moléculas de RNA que possuem propriedades catalíticas. Sua atividade catalítica depende das características estruturais das proteínas (LENINGHER *et al.*, 1995).

A estrutura tridimensional (estrutura terciária) das enzimas determina seu elevado grau de especificidade ao substrato, sendo capazes de distinguir moléculas com estruturas muito semelhantes.

Estes biocatalisadores são produzidos por células vivas (animal, planta e microrganismos), e geralmente atuam em condições moderadas de pH, temperatura e na ausência de substâncias químicas que possam causar sua desnaturação (LENINGHER *et al.*, 1995).

As enzimas podem estar associadas a lipídios e/ou carboidratos e podem conter componentes não protéicos cataliticamente ativos, chamados coenzimas ou cofatores. Muitas delas, para serem cataliticamente ativas, necessitam de íons metálicos, atuando como ativadores e estando diretamente envolvidos na catálise (KENNEDY, 1987).

De acordo com o tipo de reação que catalisam as enzimas podem ser divididas em seis grandes grupos: 1-oxidoredutases (reações de oxido-redução), 2-transferases (reações de transferência de grupos entre moléculas, que não sejam catalisadas pelas oxidoredutases ou pelas hidrolases), 3-hidrolases (reações de hidrólise, onde a água é o receptor dos grupos transferidos), 4- liases (reações de eliminação e adição de grupos, formando ou desfazendo ligações duplas), 5-isomerases (reações de isomerização) e 6-ligases (catálise da ligação de duas moléculas com hidrólise simultânea de ATP) (KENNEDY, 1987).

2.5.1 Hidrolases

A reação de hidrólise é caracterizada pela clivagem de uma ligação química de uma molécula, acompanhada pela adição dos elementos da água. Estas reações de hidrólise acontecem no processo de despolimerização enzimática de proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos e as enzimas que catalisam este tipo de reações são chamadas hidrolases (LENINGHER *et al.*, 1995).

Dentre as principais hidrolases encontram-se as peptidases e as enzimas celulolíticas que serão usadas neste trabalho como catalisadores para a obtenção dos hidrolisados proteicos e açúcares fermentescíveis para a produção de etanol.

cisteína, proteases de ácido aspártico, proteases de treonina, proteases de ácido glutâmico e metaloproteases (WHITAKER, 1994).

Dois proteases comerciais foram selecionadas para a realização deste trabalho: Novo Pro-D[®] (Novozymes) e quimotripsina (Sigma).

A Novo Pro-D[®] é uma preparação enzimática de serina endoprotease comercializada pela Novozymes na forma líquida, estabilizada em água, glicerol e ácido fórmico. Seu componente enzimático principal é uma subtilisina produzida pela bactéria *Bacillus licheniformis*. Esta enzima opera em condições ótimas no pH alcalino na faixa de 8-10 a temperaturas de 55°C-65°C (NOVOZYMES, 2011).

A quimotripsina é uma serina endoprotease obtida a partir do pâncreas de animais. Caracteriza-se por ter especificidade por resíduos de aminoácidos aromáticos, como triptofano (Trp), fenilalanina (Phe) e tirosina (Tyr) (WHITAKER, 1994). Possui uma massa molecular de 23800 Da. É utilizada amplamente para melhorar as propriedades antialérgicas em hidrolisados de proteínas do leite. As serina proteases geralmente catalisam as hidrólises em dois passos, no qual é formado um intermediário enzima-peptídeo (ligação covalente) gerando uma perda de um aminoácido ou peptídeo. O pH ótimo de atuação desta enzima está entre 7,5-8,0. A temperatura está entre 50-55°C (SIGMA, 2011)

2.5.1.1 Enzimas Celulolíticas

As enzimas celulolíticas, ou celulases, são classificadas em três grandes grupos, de acordo com o local de atuação no substrato celulósico, a saber: endoglicanases (EnG), que clivam ligações internas da fibra celulósica; exoglicanases (ExG), que atuam na região externa da celulose; e β -glicosidases (BG), que hidrolisam oligossacarídeos solúveis em glicose. Estas enzimas atuam de forma sinérgica na degradação da celulose (KUMAR *et al.*, 2008)

As endoglicanases (EnG I, II, III e V; EC 3.2.1.4) clivam aleatoriamente as ligações internas da região amorfa, liberando oligossacarídeos com extremidades livres redutoras e não redutoras. As endoglicanases são também conhecidas como carboximetilcelulases ou endocelulases. Possuem especificidades por celulose, xiloglicanas, celulose microcristalina (Avicel) e carboximetilcelulose (CMC) (BHAT; BHAT, 1997).

As exoglicanases ou celobiohidrolases (CBH I e II; EC 3.2.1.91) clivam os segmentos expostos pela ação das endoglucanases, atuando na remoção das unidades de celbiose da extremidade não redutora da cadeia de celulose (BHAT; BHAT, 1997).

As β -glicosidases (EC 3.2.1.21), também conhecidas como celobiasas, catalisam a hidrólise de resíduos β -D-glicose terminais não redutores, liberando β -D-glicose. Apresentam ampla especificidade por β -D-glicosídeos, podendo hidrolisar também β -galactosídeos, α -L-arabinosídeos e β -D-xilanosídeos (BAYER, *et al.*, 2010).

As enzimas celulolíticas são produzidas por uma ampla variedade de bactérias, fungos aeróbios e anaeróbios, mesófilos e termófilos (BHAT; BHAT, 1997). Entretanto, celulasas de fungos aeróbios, particularmente de *Trichoderma reesei*, são as mais estudadas em relação às produzidas por qualquer outro grupo fisiológico. *T.reesei* produz pelo menos duas exoglicanases (CBHI e CBHII), seis endoglucanases (EGI, EGII, EGIII, EGIV, EGV e EGVI) e duas β -glicosidases (BGLI e BGLII) (KUMAR, *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, as celulasas têm atraído considerável atenção, devido ao seu grande potencial industrial de aplicação, tais como, em indústrias de alimentos, têxtil, papel, combustíveis e produtos químicos (KUMAR, *et al.*, 2009).

2.6 Hidrólise Enzimática de Proteínas

Os tratamentos químicos, mecânicos, térmicos ou enzimáticos permitem manipular as propriedades físico-químicas de carboidratos e macromoléculas, tais como as proteínas. Estas modificações permitem melhorar a funcionalidade e a disponibilidade dos nutrientes, produzir hidrolisados compostos por peptídeos de tamanho definido, isolar peptídeos fisiologicamente ativos e remover sabores ou odores, assim como compostos tóxicos (LAHL; BRAUN, 1994; SGARBIERI, 1996).

Nos últimos anos, o interesse pela hidrólise enzimática de proteínas e carboidratos, alternativamente à hidrólise ácida, aumentou significativamente, devido ao fato de a primeira ser conduzida em condições mais brandas e seguras, permitindo a obtenção de hidrolisados proteicos sem a formação de produtos indesejáveis (SARMADI; ISMAIL, 2010).

A hidrólise de proteínas gera peptídeos de tamanhos variados. Dependendo do grau de hidrólise estes peptídeos podem conter de 2 a 20 aminoácidos e massa molecular menor que 6.000 Da .O grau de hidrólise (GH) é a medida da extensão da degradação hidrolítica de proteínas e é considerado o meio mais prático e conveniente para controlar o processo de hidrólise (NISSEN, 1986).

A composição e a sequência de aminoácidos podem afetar a atividade dos biopeptídeos. Assim, certos peptídeos podem desempenhar várias funções no organismo, tais como, opiáceos, adsorção de minerais, atividade antimicrobiana, antioxidante, antitrombótica, hipocolesterolêmico e funções anti-hipertensivas. Além disso, em vários peptídeos têm sido encontrada propriedades multifuncionais (SARMADI; ISMAIL, 2010).

A disponibilidade de proteases industriais, produzidas principalmente por bactérias e fungos, permitiu a produção de hidrolisados de proteínas em larga escala. A maioria destes hidrolisados são obtidos a partir de proteínas do leite e da soja, embora outras fontes, como carne, peixe, ovos, cereais e proteínas vegetais têm sido utilizadas (VILLANUEVA *et al*, 1999).

Villanueva *et al.*, (1999) estudaram a hidrólise enzimática das proteínas das sementes de girassol e caracterizaram o hidrolisado produzido pela ação sequencial de uma endopeptidase (*Alcalase*®) e de uma exopeptidase (*Flavourzyme*®). A utilização combinada destas proteases rendeu um grau de hidrólise de 54,2% em 3 h de reação, e um aumento na solubilidade das proteínas, aproximadamente 90% em uma faixa de pH de 2,5 a 7,0.

Por seu alto teor de proteína, a soja é o vegetal mais utilizado para a obtenção de proteínas isoladas. As principais proteínas da soja (acima de 85%, base mássica) são a β -conglícinina e a glicínina. Outras proteínas secundárias ou glicoproteínas incluem lipoxigenases, lectinas, inibidores de tripsina e amilases. A glicínina não contém nenhum carboidrato associado, enquanto a conglícinina é uma glicoproteína contendo aproximadamente 4% de carboidratos (principalmente porções de manose) (GIBBS, *et al.*, 2004).

Recentemente, Miranda (2012) estudou a possibilidade de utilização do processo de hidrólise proteica no desenvolvimento de um produto proteico de soja de alto valor agregado e baixo custo de obtenção para aplicação em dietas para animais nobres. Para a produção dos hidrolisados protéicos foram testadas dois complexos enzimáticos comerciais *Alcalase* e *Novo-ProD*®. O melhor grau de

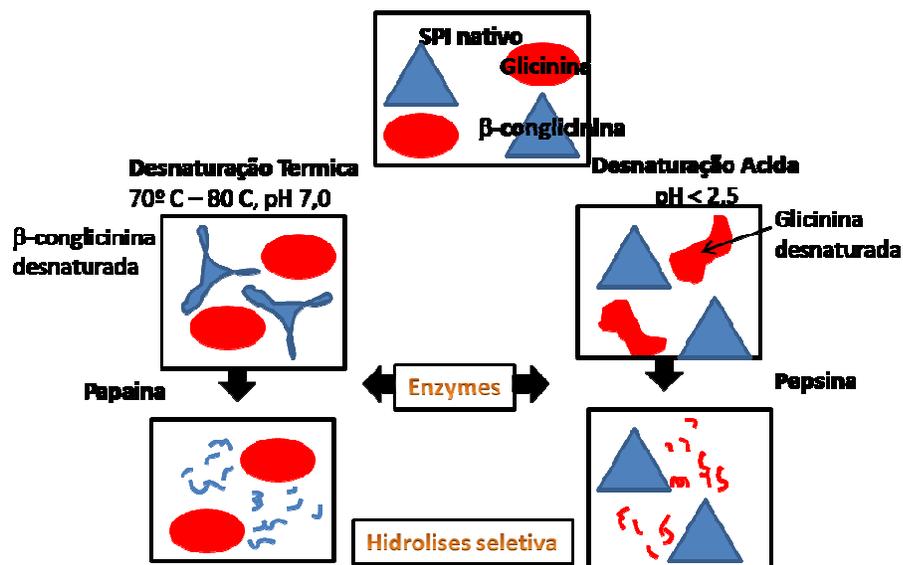
hidrólise (19%) foi obtido usando uma concentração de 1% de Novo-ProD[®] a uma temperatura de 60°C e pH 9,0 por 3h. No entanto, em experimentos realizados em escala piloto a uma temperatura de 55°C, pH 9,0 com o mesmo tempo de hidrólise foi obtido um grau de hidrólise de 15%, com 70% de peptídeos menores que 5.732 Da.

Muitos estudos têm demonstrado que a hidrólise enzimática de proteínas de soja melhora as suas propriedades funcionais e nutricionais em produtos alimentares. Esses estudos motivaram modificações genéticas das proteases para melhorar ainda mais as propriedades funcionais das proteínas isoladas da soja, como a solubilidade, capacidade de emulsificação e capacidade de formação de gel (NIELSEN, 1997).

Tratamentos mecânicos e térmicos causam desnaturação em proteínas, resultando em menor solubilidade, perda da atividade biológica e aumento de interações proteína-proteína ou interações de proteína com outras substâncias, tais como, lipídios, carboidratos e minerais.

As proteínas de soja, glicinina e β -conglucina podem ser seletivamente hidrolisadas usando SPI *in natura* como substrato, aproveitando as condições de desnaturação de cada proteína. Uma possível hipótese (Figura 2.9) para explicar esta proteólise seletiva foi feita por Tsumura (2009). Quando SPI *in natura*, constituído de glicinina e β -conglucina nativas, é submetido a uma condição específica, tal como, pH ácido (1,5 a 2,5) ou temperatura elevada (cerca de 70°C), ocorre a desnaturação seletiva de glicinina ou β -conglucina, respectivamente. Assim, enquanto a fração desnaturada pode ser facilmente hidrolisada por alguma protease, a outra fração pode ser resistente a essa hidrólise, resultando em uma proteólise seletiva. Desta forma, a desnaturação de glicinina ou β -conglucina pode desempenhar um importante papel na proteólise seletiva. Resultados obtidos por estes pesquisadores confirmaram que a presença de SPI *in natura* é necessária para a proteólise seletiva, enquanto que a especificidade das proteases utilizadas não é necessariamente importante

Figura 2.9 - Representação esquemática da proteólise seletiva do SPI nativo.



Fonte: TSUMURA, 2009

Hidrólise de proteínas da soja, seja no seu estado natural ou processada na forma de farelo, é amplamente reportada na literatura (MIRANDA, 2012; FISCHER 2006; SUN, 2011). Entretanto, vale destacar que até onde se sabe, não há trabalhos reportados sobre recuperação de proteínas da casca de soja por meio de hidrólise enzimática.

2.7 Pré-tratamentos

A produção de etanol a partir da biomassa lignocelulósica compreende quatro etapas principais: pré-tratamento, hidrólise enzimática e/ou ácida da celulose ou hemicelulose, fermentação por microrganismos dos açúcares liberados, e finalmente, recuperação e purificação do etanol para atender às especificações do combustível.

A tarefa de hidrolisar o material lignocelulósico aos monossacarídeos fermentescíveis é ainda um problema tecnológico porque a degradação enzimática da celulose é dificultada por vários fatores relacionados à estrutura do complexo lignocelulósico, tais como, cristalinidade, porosidade e revestimento da celulose por lignina. Devido a estas características estruturais, o pré-tratamento é uma etapa essencial para a obtenção de açúcares monoméricos durante a hidrólise da

celulose. Neste contexto, o objetivo do pré-tratamento é quebrar a barreira protetora de lignina e romper a estrutura cristalina da celulose, tornando assim os carboidratos mais acessíveis às enzimas a fim de aumentar o rendimento de açúcares fermentescíveis (MOSIER, *et al.*, 2005; TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

De acordo com Yang e Wyman (2008), um pré-tratamento eficiente e econômico deve atender aos seguintes requisitos:

- Mínima necessidade de produtos químicos nas etapas subsequentes de neutralização e condicionamento de pré-fermentação;
- Evitar a moagem da biomassa, já que este processo implica em um alto custo de energia;
- Alcançar altos rendimentos de açúcares fermentescíveis sem nenhuma degradação de carboidratos;
- A concentração de açúcares das operações combinadas de pré-tratamento e hidrólise enzimática deve estar acima de 10% para assegurar que as concentrações de etanol sejam adequadas;
- Uso de reatores de pré-tratamento de baixo custo, com condições moderadas de operação;
- Recuperação da lignina e outros componentes a fim de serem utilizados na produção de subprodutos de alto valor agregado;
- Minimizar a demanda de calor e energia ou permitir que a energia utilizada seja integrada termicamente com o resto do processo;
- Evitar a formação de produtos de degradação de açúcares e lignina que são inibitórios para a hidrólise e fermentação;
- Obtenção de celulose altamente digestível com rendimentos superiores a 90% na hidrólise enzimática em um tempo de três dias e com baixas cargas de celulase (inferior a 10 FPU / grama de celulose).

Um pré-tratamento universal é difícil imaginar, devido à diversidade de matérias-primas (biomassas diferentes). Portanto, se faz necessário adotar uma adequada tecnologia para o pré-tratamento de um determinado material lignocelulósico. De acordo com as forças que atuam ou com o tipo de energia consumida no processo, os pré-tratamentos podem ser classificados basicamente em biológicos, físicos, químicos ou combinados.

2.7.1 Pré-tratamentos físicos

Pré-tratamento físico consiste basicamente na redução do tamanho das partículas e da cristalinidade do complexo lignocelulósico, a fim de aumentar a superfície específica e reduzir o grau de polimerização, de modo que as celulases possam ter acesso aos materiais da parede celular com menor interferência da lignina e da hemicelulose. Um exemplo, é a moagem da biomassa seca que implica um gasto intensivo de energia e não se torna prático em grande escala. Neste pré-tratamento, a maior parte da lignina, xilana e celulose permanecem na fase sólida (TAHERZADEH e KARIMI, 2008; ZHU, 2008).

2.7.2 Pré-tratamentos biológicos

O pré-tratamento biológico utiliza enzimas ou microrganismos para produzir açúcares simples dos polímeros de carboidratos com mínima moagem mecânica da biomassa. No entanto, o inconveniente principal de aplicar o pré-tratamento biológico é a baixa velocidade de hidrólise em comparação com os pré-tratamentos térmicos ou químicos (SUN e CHENG, 2002).

A degradação da lignina pela ação de fungos brancos é considerada o pré-tratamento biológico mais eficaz para materiais lignocelulósicos. Essa degradação ocorre através da ação de enzimas que degradam a lignina, tais como peroxidases e lacases (KUMAR, *et al.*, 2009).

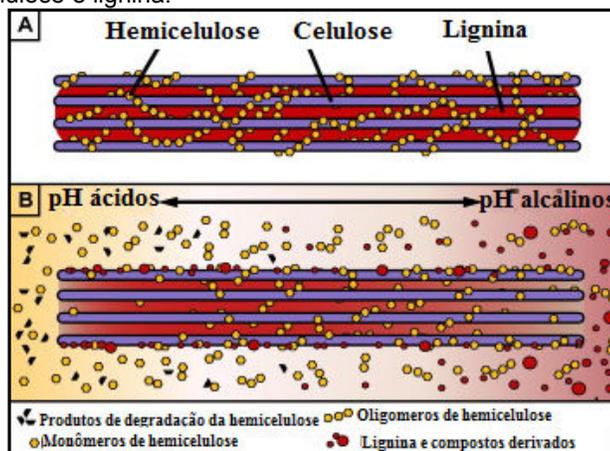
Estudos recentes têm demonstrado a viabilidade do pré-tratamento por fungos para melhorar a digestibilidade enzimática em diversas fontes de biomassa, tais como, palha de milho (XU, *et al.*, 2010), palha de trigo (DIAS, *et al.*, 2010), palha de arroz (BAK, *et al.*, 2009), e biomassa lenhosa (YU, *et al.*, 2009).

2.7.3 Pré-tratamentos químicos

Pré-tratamento químico é o método mais utilizado na atualidade. A biomassa é pré-tratada por meio de ácido ou base, geralmente em combinação com calor e/ou pressão. Muitos catalisadores têm sido utilizados na conversão da biomassa, incluindo ácidos concentrados e diluídos, líquidos iônicos, explosão a vapor, álcalis, solventes orgânicos e amônia.

Hidróxidos de sódio, potássio, cálcio e amônio são os catalisadores mais comuns usando nos pré-tratamentos alcalinos. NaOH produz um aumento da superfície interna da celulose, diminuindo o grau de polimerização e cristalinidade, o que provoca a desestruturação da lignina. No entanto, o principal objetivo dos pré-tratamentos ácidos é solubilizar a fração hemicelulósica da biomassa para tornar a celulose mais acessível às enzimas. A hidrólise com ácido diluído é provavelmente o método mais comumente aplicado entre os métodos de pré-tratamentos químicos. Este pode ser usado tanto como um pré-tratamento de materiais lignocelulósicos prévio à hidrólise enzimática, ou como hidrólise para a obtenção dos açúcares fermentescíveis (MOSIER, *et al.*, 2005; TAHERZADEH; KARIMI, 2008). A Figura 2.10 ilustra o efeito do pH (pré-tratamento ácido ou alcalino) sobre os componentes principais do material lignocelulósico.

Figura 2.10 - Modelo da parede celular que mostra o efeito geral do pH sobre a solubilização de hemicelulose e lignina.



Fonte: Adaptação de GARLOCK et al, 2011.

Dentre os tratamentos ácidos, o pré-tratamento com ácido sulfúrico diluído é o mais amplamente usado em diversas biomassas lignocelulósicas, tais como, resíduos de milho e arroz (TORGET, *et al.*, 1991; SUMPHANWANICH, *et al.*, 2008), palha de cevada (PANAGIOTOPOULOS *et al.*, 2012), madeiras (NGUYEN, *et al.*, 2000) resíduos de mango, de pino e bagaço de cana (HERNANDEZ, *et al.*, 2012) Em 2005, Fogel *et al.*, estudaram a otimização de hidrólise ácida de Bagaço de cana para a produção de xilitol por *Candida guilliermondii*, eles encontraram que para uma relação 1:4 (sólido-líquido) foi possível atingir uma concentração máxima

de 57.25 g/L de xilose, usando ácido sulfúrico 3%, temperatura de 120°C, 40 minutos e pressão de 1 atmosfera.

Recentemente, Chen *et al.* (2012) estudaram as características da hidrólise do bagaço de cana pré-tratado por uma solução diluída de ácido em um ambiente irradiado por microondas. A biomassa foi submersa em uma solução diluída de ácido sulfúrico a 180°C durante 30 min, variando a concentração de 0 a 0,02 molL⁻¹. Eles encontraram que cerca de 40-44% em peso de bagaço é degradado a partir do pré-tratamento e aproximadamente de 80-98% da hemicelulose é hidrolisada. No entanto, a celulose cristalina e lignina não foram afectados pelo pré-tratamento. Os resultados indicaram que usando uma concentração de ácido de 0,005 molL⁻¹ foi possível obter rendimentos máximos de xilose e glicose, com mínima selectividade furfural.

O pré-tratamento ácido para a remoção da hemicelulose da casca de soja tem sido estudado por diversos autores (CORREDOR, *et al.*, 2008; CASSALES, *et al.*, 2011). Recentemente, Casales *et al.* (2011) estudaram a otimização da hidrólise ácida da casca de soja. A cinética de hidrólise mostrou que a melhor condição para a recuperação dos açúcares foi 153°C, H₂SO₄ 1,7% (m/m) e 60min, atingindo uma eficiência de 87%. Usando 118°C, H₂SO₄ 2,7% (m/m) e 40min, obtiveram 59% de hidrólise, com uma concentração baixa de compostos tóxicos (< 4 g/L), mantendo constante a razão sólido/líquido (1:10). No entanto, uma diversidade de pré-tratamentos tem sido empregada para a produção de etanol a partir de esta biomassa lignocelulósica. A Tabela 2.3 resume os principais pré-tratamentos da casca de soja reportados na literatura, visando à obtenção de etanol.

Tabela 2.3 - Pré-tratamentos realizados para a obtenção de etanol da casca de soja

Autores	Karuppuchamy et al, 2009	Lamsal et al, 2010	Yoo et al, 2011	Mielezet al, 2009	Casales et al, 2011
Pré-tratamento	Extrusão Micro-ondas	Extrusão	Ácido Alcalino Extrusão	SSF sem Pré-tratar	Ácido

SSF = Sacarificação e fermentação simultânea

Dentre os vários pré-tratamentos químicos utilizados, o pré-tratamento por organossolve se destaca como uma estratégia promissória na produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos. Neste processo, o material lignocelulósico é suspenso e aquecido com uma mistura de solvente orgânico e água, para dissolver a lignina e parte da hemicelulose, deixando a celulose

disponível para o ataque enzimático. Dentre os vários solventes orgânicos utilizados, destacam-se metanol, etanol, acetona, etilenglicol e álcool tetra-hidrofurfurílico. Além dos solventes, um catalisador pode ser adicionado para reduzir a temperatura de operação ou para reforçar o processo de deslignificação. Comparado a outros pré-tratamentos químicos, a principal vantagem do processo organossolve é a recuperação de lignina com uma pureza relativamente alta (PAPATHEOFANOUS, *et al.*, 1995; TAHERZADEH; KARIMI, 2008; ALVIRA, *et al.*, 2010).

O etanol é o solvente mais usado no processo organossolve, embora ele cause inibição das enzimas celulolíticas. Portanto, este deve ser removido da fração sólida antes da hidrólise enzimática. Um estudo recente (WOLF, 2011) avaliou diferentes condições operacionais de pré-tratamento organossolve do bagaço de cana, seguido ou não de deslignificação alcalina, catalisado ou não com ácido, visando à aplicação da celulose para produção de etanol e da xilana para produção de xilooligossacarídeos (XOS). A melhor condição encontrada para a recuperação da xilana foi 170°C/60min/50% etanol o que representou um rendimento de 75% com relação a xilana inicial do bagaço. As análises deste licor negro indicaram a presença de 54,5% de xilooligômeros e apenas 2% de xilose. No entanto, nesta condição também foi possível recuperar 67% da lignina .

De acordo com o exposto anteriorente existe uma ampla gama de pré-tratamentos que podem ser aplicados a extensa variedade de material lignocéluloso para a produção de etanol de segunda geração,.

2.8 Hidrólise de celulose

O processo de produção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos requer uma etapa de hidrólise da celulose e hemicelulose, expostas após a etapa de pré-tratamento, para a obtenção dos açúcares fermentescíveis xilose e glicose.

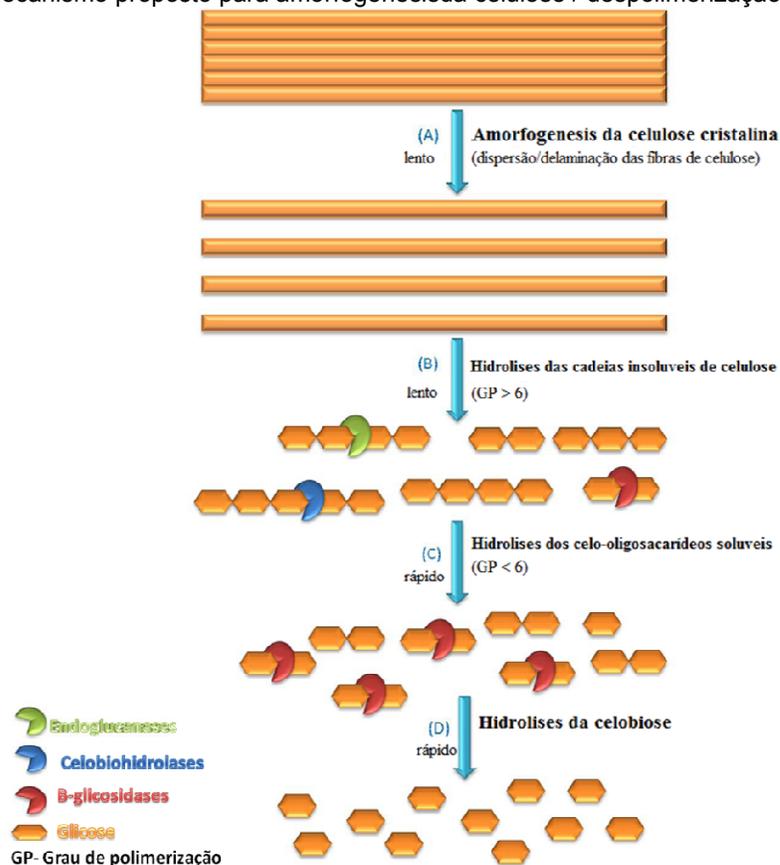
A celulose pode ser decomposta hidroliticamente em glicose na presença de catalisadores enzimáticos ou ácidos. A hidrólise com ácidos diluídos é altamente eficiente, no entanto, requer temperaturas elevadas (200-240°C) para alterar a estrutura dos cristais de celulose. Além disso, é sabido que este tipo de hidrólise também causa degradação das pentoses e hexoses, resultando em elevadas concentrações de compostos tóxicos (HMF e fenólicos) que inibem os

microrganismos usados na fermentação (ALMEIDA *et al.*, 2007; SUN; CHENG, 2002). Outras desvantagens que podem ser citadas para este processo é a recuperação do ácido, a neutralização do hidrolisado e a utilização de equipamentos caros que sejam resistentes à corrosão. Neste contexto, a hidrólise enzimática é uma alternativa atraente por ser conduzida em condições brandas (45-50°C, pH 4,8), evitando problemas de corrosão e formação de compostos inibidores (DUFF; MURRAY, 1996; MOSIER, *et al.*, 2005; LIMAYEM; RICKE, 2012)).

A sacarificação enzimática da celulose é geralmente descrita como um sistema de reação heterogênea em que celulasas em um ambiente aquoso reagem com a celulose insolúvel, que contem regiões cristalinas e amorfas (ARANTES; SADDLER, 2010).

Em 1985, Coughlan utilizou o termo 'amorphogenesis' para sugerir um possível mecanismo (Figura 2.11) que descreve a dispersão, ou delaminação do substrato celulósico, resultado numa redução no grau de cristalinidade e na criação de uma maior área superficial através do aumento da superfície reativa interna, enquanto estas fibrilas permanecem molecularmente inalteradas (amorphogenesis). Neste sentido, a hidrólise enzimática de celulose estaria constituída por três etapas: adsorção das enzimas celulolíticas à superfície da celulose, biodegradação da celulose a açúcares fermentescíveis e, finalmente, dessorção das celulasas. Assim, para que as celulasas possam hidrolisar de forma eficiente os substratos celulósicos, elas devem primeiramente ser capazes de acessar as cadeias de celulose que estão firmemente empacotadas na forma de microfibrilas insolúvel e recobertas de hemicelulose e lignina. Uma vez que a rede de celulose está acessível às enzimas, a ação sinérgica de endo e exoglucanases promovem a fragmentação das moléculas acessíveis de celulose a celo-oligossacarídeos (moléculas de celulose com um grau de polimerização de menos de 6 unidades) (Figura 2.11b), que são rapidamente hidrolisadas em sua maior parte em celobiose (Figura 2.11c) (SUN; CHENG, 2002; ARANTES; SADDLER, 2010).

Figura 2.11 - Mecanismo proposto para amorfogenesida celulose / despolimerização por celulasas



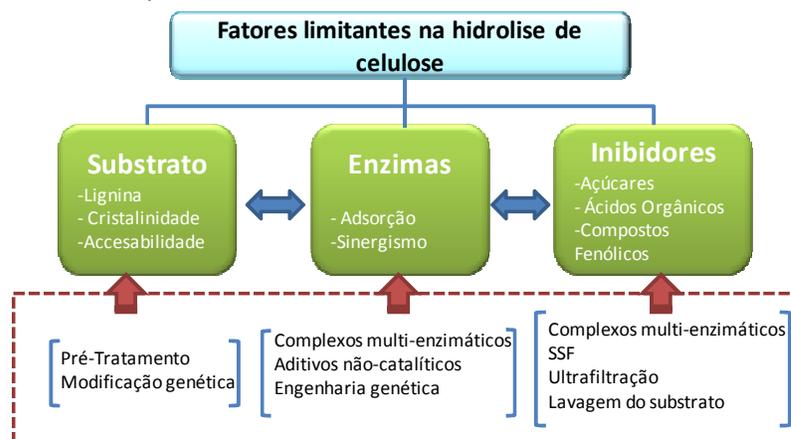
Fonte: ARANTES *et al*, 2010

Embora a hidrólise enzimática seja conduzida nas condições ótimas de operação (pH, temperatura, carga enzimática, relação sólido-líquido), esta pode ser afetada por diversos fatores. Os principais fatores que limitam a hidrólise enzimática da celulose podem ser divididos em três categorias gerais (Figura 2.12):

1. Características do substrato, como barreira da lignina e área superficial acessível;
2. Adsorção e sinergismo de enzimas;
3. Presença de compostos inibidores, tais como, açúcares e ácidos orgânicos.

A Figura 2.12 apresenta um resumo com as principais estratégias sugeridas por Huang, *et al.* (2011) para minimizar a influência dos fatores limitantes na hidrólise enzimática da celulose.

Figura 2.12 - Os principais fatores que limitam a hidrólise da celulose e correspondentes estratégias ou métodos para minimizar suas influências

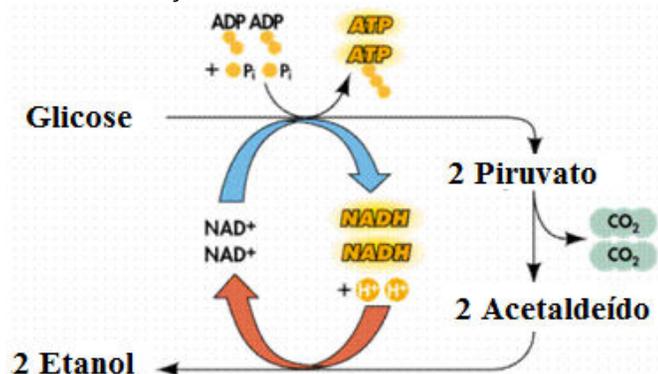


Fonte: HUANG *et al*, 2011

2.9 Fermentação alcoólica de glicose

A biomassa sacarificada é utilizada para a fermentação por vários microrganismos. No entanto, a utilização industrial para produção de bioetanol a partir de materiais lignocelulósicos é dificultada pela falta de microrganismos que possam fermentar eficientemente tanto pentoses e hexoses. A fermentação é promovida por microrganismos aerobiamente cultivados em meio composto de glicose e nutrientes inorgânicos (MADHAVAN, *et al.*, 2012; TALEBNIA *et al.*, 2010).

Figura 2.13 - Processo de fermentação ao nível celular



Fonte: Estrella Mountain

O objetivo primordial da levedura, ao metabolizar aerobiamente o açúcar é gerar uma forma de energia (ATP, adenosina trifosfato) que será

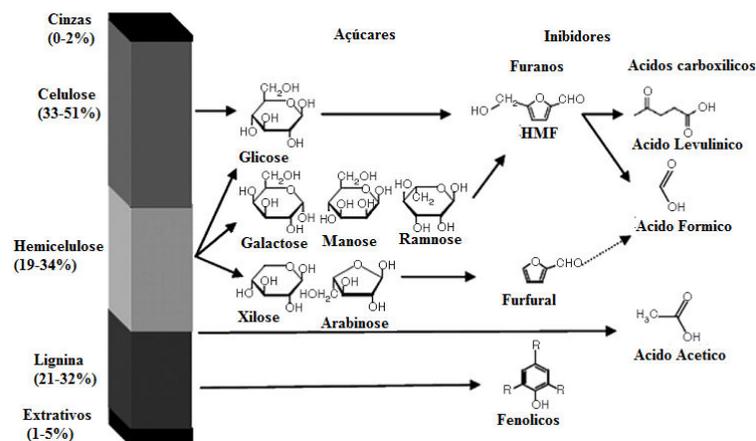
empregada na realização dos diversos trabalhos fisiológicos e biossínteses, necessários à manutenção da vida, crescimento e multiplicação, para perpetuar a espécie. O etanol e o CO₂ resultantes se constituem tão somente produto de excreção sem utilidade metabólica para a célula em anaerobiose (Figura 2.13).

A transformação do açúcar (glicose) em etanol e CO₂ envolvem 12 reações em sequência ordenada, cada qual catalisada por uma enzima específica. A levedura *Saccharomyces cerevisiae* um microrganismo aeróbio facultativo, ou seja, tem a habilidade de se ajustar metabolicamente tanto em condições aeróbicas e anaeróbicas. Assim, quando uma porção do açúcar é transformada em biomassa, CO₂ e H₂O em aerobiose, a maior parte é convertida em etanol e CO₂ em anaerobiose, processo denominado fermentação alcoólica (LIMA, BASSO; AMORIN, 2001).

No processo de fermentação alcoólica dos açúcares hidrolisados a partir de materiais lignocelulósicos, os microrganismos podem ser inibidos por uma série de compostos químicos, produtos da degradação dos componentes do complexo lignocelulósico gerados nas etapas de pré-tratamento e hidrólise ácida. Estes produtos inibidores (Figura 2.14) se agrupam em três categorias principais (ALMEIDA, *et al.*, 2007):

- (i) Derivados de furano: compreende basicamente os compostos de furano 5-hidroximetil-2-furaldeído (HMF) e 2-furaldeído (furfural) que são formados pela desidratação de hexoses e pentoses, respectivamente.
- (ii) Ácidos alifáticos de baixa massa molecular: ácido acético, fórmico e levulínico são os ácidos fracos mais comumente encontrados nos hidrolisados lignocelulósicos. O ácido acético é formado pela desacetilação da hemicelulose, enquanto os ácidos fórmico e levulínico são produtos de degradação do HMF. No entanto, o ácido fórmico pode ser adicionalmente formado a partir de furfural sob condições ácidas e temperaturas elevadas.
- (iii) Compostos fenólicos: este grupo de inibidores inclui uma vasta gama de compostos aromáticos e poliaromáticos, originados a partir da degradação da lignina e dos carboidratos durante a hidrólise ácida.

Figura 2.14 - Composição média da biomassa lignocelulósica e os principais produtos de hidrólise e compostos inibidores derivados dos pré-tratamentos



Fonte: ALMEIDA et al, 2007.

Além dos compostos citados acima, os produtos provenientes do processo de fermentação, tais como etanol, ácido acético, glicerol e ácido láctico, também podem inibir a ação do microrganismo (OLSSON; HAHNHAGERDAL, 1996).

Os processos geralmente utilizados na fermentação do hidrolisado lignocelulósico são sacarificação e fermentação simultânea (SSF) e hidrólise separada e fermentação (SHF). Convencionalmente, na produção de etanol tem sido empregado o processo SHF, no entanto, a SSF resultaria ser um método mais eficiente, já que este pode melhorar a produção de álcool devido à redução da inibição pelo produto final e eliminar a necessidade de reatores separados. Na tabela 2.4 se resume as principais características e vantagens dos processos SSF e SHF.

Tabela 2.4 - Comparação entre os principais processos de fermentação

Processo de Fermentação	Caraterísticas e vantagens	Limitações
Sacarificação e fermentação simultânea	-Baixo custo -Altos rendimentos de etanol devido à remoção dos produtos inibidores formados na sacarificação -Redução do número de reatores.	-Condições ótimas distintas de temperatura para a hidrólise enzimática e fermentação.
Hidrólise e fermentação separadas	-Cada etapa pode ser processada nas condições ótimas de operação	-Os produtos finais da hidrólise causam inibição das enzimas, reduzindo o rendimento de etanol. -Possibilidade de contaminação devido ao extenso tempo do processamento.

Fonte: SARKAR et al, 2012

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

A Casca de soja (CS) foi doada pela IMCOPA Imp. Exp. Ind. De Óleo S.A (Araucária, PR); Novo-ProD[®](protease Subtilisina de *Bacillus licheniformis*, com atividade declarada de 16 KNPU-S/g) foi doada pela Novozymes Latin America Ltda (Araucária, PR); Acellerase[®] 1500 de *Trichoderma reesei* foi doada pela Genencor[®] (Palo Alto, CA); quimotripsina (SIGMA); levedura *Saccharomyces cerevisiae* (fermento de panificação Fleischmann) foi adquirida no comércio local. Os reagentes e padrões utilizados foram:

- Ácido acético (Quemis)
- Ácido fórmico (Quemis)
- Ácido glucurônico (Sigma)
- Acido galacturônico (Sigma)
- Ácido sulfúrico (Quemis)
- Celobiose (Fluka)
- Arabinose (Sigma)
- Furfural (Sigma-Aldrich)
- Glicose (Synth)
- HMF (Sigma)
- Sulfato de Cobre (Quemis)
- Sulfato de Potasio (Quemis)
- Hidróxido de sódio (Quemis)
- Extrato de levedura (Acumedia)
- Acido Bórico (Quemis)
- Sulfato de Magnésio (Synth)
- Uréia (Synth)
- Xilose (Synth)

Os equipamentos utilizados para a determinação experimental foram:

- pH Stat Titrino modelo 718;
- Balança analítica da marca Denver Instrument com precisão de $\pm 0,001$ g;
- Autoclave vertical modelo 103 da marca Fabbe-Primar;

- Balança da marca Gehaka precisão de $\pm 0,01$ g;
- Banho termostático modelo MA-184 da marca Marconi com precisão de $\pm 0,01$ °C;
- Centrífuga 5810R da marca Eppendorf;
- Cromatógrafo Shimadzu LC-10AD;
- Espectrofotômetro UV-Visível Ultrospec 200 da marca Pharmacia Biotech;
- Estufa de secagem da Nova Ética;
- Incubadora Refrigerada MA-830 da marca Marconi;
- Balança determinadora de umidade ID-50 versão 1.8 da marca Marte;
- Medidor de pH 710^a da marca Orion.

3.2 Métodos

3.2.1 Determinação do teor de Umidade

O teor de umidade da casca de soja foi determinado usando uma balança de secagem automática da marca Marte – modelo ID50 a partir de 1 g de sólido aquecido com uma fonte de calor infravermelho até atingir uma temperatura constante de 105°C. Para realizar a caracterização do material lignocelulósico foi necessário secar previamente as amostras até uma umidade de aproximadamente 10%.

3.2.2 - Caracterização Química da Biomassa Lignocelulósica

Foram realizadas análises para determinar a composição química em base seca (cinzas, extrativos, análise de carboidratos, lignina solúvel e insolúvel) da casca da soja (CS) *in natura*, após hidrólises das proteínas e pré-tratamentos químicos (todos secos até aproximadamente 10% de umidade), seguindo a metodologia de Rocha et al. (1997), validada para o bagaço de cana por Gouveia et al. (2009). Os protocolos padrões utilizados são descritos a seguir.

3.2.2.1 Determinação do teor de extrativo

A casca de soja *in natura* foi submetida a um processo de extração alcoólica dos componentes solúveis.

Para determinar o conteúdo de extrativos, pesaram-se 4 g de casca de soja *in natura* em um cartucho de celulose e colocaram-se em um aparelho de extração Soxhlet. Um volume de 400 mL de etanol 95% foi colocado num balão de 500 mL, que foi posteriormente aquecido usando uma manta térmica. O sistema foi deixado à temperatura de ebulição do álcool etílico por um período de 8 horas. Em seguida foram retirados os cartuchos com as amostras e secos em uma estufa a 105 °C até atingir peso constante. A porcentagem de extrativos presentes no material foi calculada usando a equação (3.1):

$$\% \text{ Extrativos} = \left(\frac{M_{ci} - M_{cf}}{M_{ci}} \right) \times 100 \quad (3.1)$$

onde,

M_{ci} = Massa de casca inicial (g)

M_{cf} = Massa de casca após extração alcoólica (g)

3.2.2.2 Hidrólise Ácida

Pesou-se 1 g de amostra (no caso da casca de soja de soja *in natura* esta hidrólise foi realizada após remoção dos extrativos) em base seca em um béquer de 100 mL, adicionou-se 10 mL de uma solução concentrada de ácido sulfúrico 72% (m/m) pré-aquecida a 45°C e colocou-se esta mistura em um banho termostático (Marconi, MA-184) à mesma temperatura do ácido por 7 min sob vigorosa agitação usando um bastão de vidro.

A hidrólise foi interrompida com a adição de 50 mL de água e um volume adicional de água (225 mL) foi usado para retirar toda a massa sólida do béquer, transferindo-a para um erlenmeyer de 500 mL.

O erlenmeyer foi tampado e colocado em uma autoclave por 30 min para continuar a hidrólise dos oligômeros. Após autoclavagem, a amostra era esfriada a temperatura ambiente e filtrada em um funil de vidro contendo filtro

qualitativo previamente pesado e seco em uma estufa a 105°C. A fração líquida foi recolhida em um balão volumétrico de 500 mL e seu volume foi completado com água de lavagem do sólido remanescente no filtro.

A fração líquida da hidrólise foi usada para as análises posteriores de carboidratos, ácidos orgânicos, lignina solúvel, e produtos de degradação de hexoses (5-hidroximetil-2-furaldeído, HMF) e pentoses (2-furaldeído, MF). A fração sólida retida no papel de filtro foi usada para determinação da lignina insolúvel e cinzas.

3.2.2.3 Determinação de lignina solúvel

A lignina solúvel em meio ácido foi quantificada por espectrofotometria a 280 nm em espectrofotômetro UV-visível (Ultrospec-2000, Pharmacia Biotech). Uma alíquota de 5 mL da fração líquida foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL com a adição de 1,5 mL de NaOH 6,5 molL⁻¹ até pH final próximo de 12. Após homogeneização, o volume foi completado usando água destilada e esta nova solução foi usada para determinar a leitura da absorvância no espectrofotômetro, utilizando uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho ótico.

A concentração de lignina solúvel no hidrolisado ácido foi determinada usando a equação (3.2) que subtrai os produtos de degradação dos açúcares (HMF e MF) determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), descrita na seção 3.2.2.5.

$$C_{lignina}(g/L) = 4,187 \cdot 10^{-2}(A_t - A_{pd}) - 3,297 \cdot 10^{-4} \quad (3.2)$$

Onde:

A_t = absorvância do hidrolisado ácido em 280 nm;

A_{pd} = absorvância de HMF e MF em 280 nm, calculada pela equação

(3.3).

$$A_{pd} = (C_1 \cdot \varepsilon_1) + (C_2 \cdot \varepsilon_2) \quad (3.3)$$

Sendo:

C_1 = concentração de MF no hidrolisado em (g/L), determinada por CLAE;

C_2 = concentração de HMF no hidrolisado em (g/L), determinada por CLAE;

ε_1 = ¹absortividade do MF (146,85 L.g⁻¹);

ε_2 =absortividade do HMF (114 L.g⁻¹).

3.2.2.4 Análise dos carboidratos

Os produtos da hidrólise ácida (glicose, xilose, arabinose, ácido acético, etc.) foram quantificados por CLAE em um cromatógrafo Shimadzu SCL-10A, equipado com detector de índice de refração RID 10-A. A separação dos compostos era realizada em uma coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) da Bio-Rad, utilizando como fase móvel ácido sulfúrico 5mM a uma vazão de 0,6 mL.min⁻¹ e temperatura do forno a 45°C. As amostras de hidrolisado eram previamente filtradas em cartuchos de extração Sep-Pack[®] C-18 Waters para a remoção dos compostos fenólicos.

Para quantificar os carboidratos e ácidos carboxílicos, foram construídas curvas de calibração a partir de padrões de glicose, xilose, arabinose, celobiose, ácido glucorônico, ácido acético, ácido fórmico e ácido galacturônico (unidade monomérica de pectinas presentes na casca de soja).

3.2.2.5 Determinação de MF e HMF

Os produtos da degradação de pentoses e hexoses (MF e HMF) foram analisados por CLAE, usando uma coluna Bondapack C-18 (5µm) de 125 x 4 mm (Hewlett-Packard), com fase móvel acetonitrila/água 1:8 (v/v) e 1% de ácido acético, a uma vazão de 0,8 mL. min⁻¹, à temperatura de 25 °C.

Uma alíquota da fração líquida da hidrólise ácida foi filtrada em membranas de 0,45 µm (Sartorius, StedimBiotech) para total remoção das partículas sólidas. Os compostos foram detectados a 274 nm, usando um detector UV-visível Shimadzu SPD-10. As concentrações de HMF e MF foram determinadas a partir de curvas de calibração construídos a partir dos componentes puros.

3.2.2.6 Determinação da lignina insolúvel

¹ Os valores de absortividades de HMF e MF foram tomados de Rocha et al, 2007

O material sólido retido no filtro após hidrólise ácida foi usado para a quantificação da lignina insolúvel em meio ácido. Então, o papel de filtro, contendo o material residual (lignina e cinzas), foi lavado com 2 litros de água destilada para remoção total de H₂SO₄ e seco em estufa à temperatura de 105°C até massa constante. A porcentagem de lignina (m/m) foi calculada com relação à massa de amostra inicial descontando-se a quantidade de cinzas presentes no material hidrolisado usando a equação (3.4).

$$\% \text{ Lignina}_{insol} = \frac{M_{filtros} - M_{cinzas}}{M_{inicial}} \times 100 \quad (3.4)$$

3.2.2 7 Determinação de cinzas

As análises de determinação de cinzas foram feitas para amostras de casca de soja *in natura* e material sólido usado na quantificação de lignina insolúvel.

O material sólido resultante da determinação da lignina insolúvel foi colocado cuidadosamente em um cadinho com tampa, previamente calcinado e tarado. Posteriormente, este cadinho foi pré-calcinado por 1 hora em uma mufla (7000, EDG equipamentos) à temperatura de 400°C. Após 1 hora, retirou-se a tampa do cadinho e calcinou-se o material por mais 2 horas.

O cadinho contendo as cinzas foi retirado da mufla, mantido em dessecador até resfriamento à temperatura ambiente e pesado. A massa de cinzas (diferença entre cadinho+amostra– cadinho vazio) foi usada no cálculo da lignina insolúvel.

Para a determinação de cinzas totais na casca *in natura* usou-se uma massa de 2 g, seguindo o procedimento descrito anteriormente. A porcentagem de cinzas do material lignocelulósico foi determinada em relação à massa inicial (base seca).

3.2.3 Determinação do teor de proteínas

O teor de proteínas na casca de soja (pré-tratadas e *in natura*) foi determinado pelo método de Kjeldahl, (COTTA *et al.*, 2007; LABCONCO,2010), cujo procedimento consistiu, basicamente, nas seguintes etapas:

Digestão da amostra: Adicionou-se ao tubo de digestão 1 g de catalisador ($\text{CuSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$, 1:10, m/m) e aproximadamente 200 mg de casca de soja. Em seguida, foram adicionados 10 mL de ácido sulfúrico, e colocados posteriormente no bloco digestor por 2,5 h a uma temperatura aproximada de 250°C. No caso de amostras líquidas (hidrolisado proteico, ácido,) foram usadas alíquotas de 3mL de hidrolisado. Após a digestão, as amostras foram esfriadas até temperatura ambiente .

Destilação: Os tubos contendo as amostras digeridas foram colocados em um destilador (BUCHI 323), e em seguida adicionou-se uma solução de NaOH 10 molL⁻¹ até surgimento de cor preta. Posteriormente, as amostras foram destiladas por um tempo de 6 min e a amônia liberada foi absorvida em um erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de ácido bórico 20 g/L e 3 gotas de indicador misto.

Titulação: A amônia recolhida nos erlenmeyer foi titulada com uma solução padronizada de HCl 0,01 molL⁻¹ e o volume gasto foi utilizado no cálculo do nitrogênio total das amostras.

Quantificação do teor de proteínas nas amostras: O teor de proteínas total nas amostras líquidas foi calculado utilizando-se as equações 3.5 e 3.6 :

$$C_N(g/L) = \frac{V_{HCl} \times C_{HCl} \times 14}{V_{amostra}} \quad (3.5)$$

$$Proteina(g/L) = C_N(g/L) * 6,25 \quad (3.6)$$

Onde:

C_N = Concentração de nitrogênio total (g/L)

V_{HCl} = Volume de ácido gasto na titulação (mL)

C_{HCl} = Concentração de ácido clorídrico usado na titulação (mol/L)

14 = massa molecular do nitrogênio

$V_{amostra}$ = volume da amostra em mL

6,25 = Fator de conversão de nitrogênio total para nitrogênio proteico para proteínas de soja

Para a quantificação do teor de proteínas nas amostras sólidas utilizaram-se as equações (3.7) e (3.8).

$$C_N(g/g) = \frac{V_{HCl} \times C_{HCl} \times 14}{M_{amostra} \times 1000} \quad (3.7)$$

$$\%Proteina(m/m) = C_N(g/g) \times 6,25 \times 100 \quad (3.8)$$

Onde:

C_N = Concentração de nitrogênio total na amostra (g/g)

$M_{amostra}$ = massa seca de amostra (g)

$\%Proteina$ = Porcentagem de proteínas na amostra (base seca)

3.2.4 – Determinação do tamanho dos peptídeos

A composição por faixa molecular das proteínas hidrolisadas foi determinada usando cromatografia líquida por exclusão de tamanho. As análises foram feitas em um cromatógrafo Shimadzu LC-6A equipado com detector UV-Visível (Shimadzu SPD-10AV) e coluna Superdex 75 (3000-70000 Da) da Amersham Biosciences. A fase móvel utilizada foi tampão fosfato de sódio 50 mM-NaCl 0,15 M, pH 7, com um fluxo de 0,5 mLmin⁻¹, e os peptídeos foram detectados em 214 nm.

As amostras foram previamente filtradas em membranas de diâmetro de poro de 0,45 µm (Milipore). Os padrões de massa molecular utilizados estão mostrados na Tabela 3.1. Todos os padrões foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Tabela 3.1 - Padrões utilizados para a determinação do perfil peptídico das proteínas hidrolisadas em casca de soja.

Padrão	Massa Molecular (Da)
Albumina	66.000
Anidrase carbônica de Eritrócitos bovino	29.000
Aprotina	6.512
Gastrina	2.859
Amida	1.314

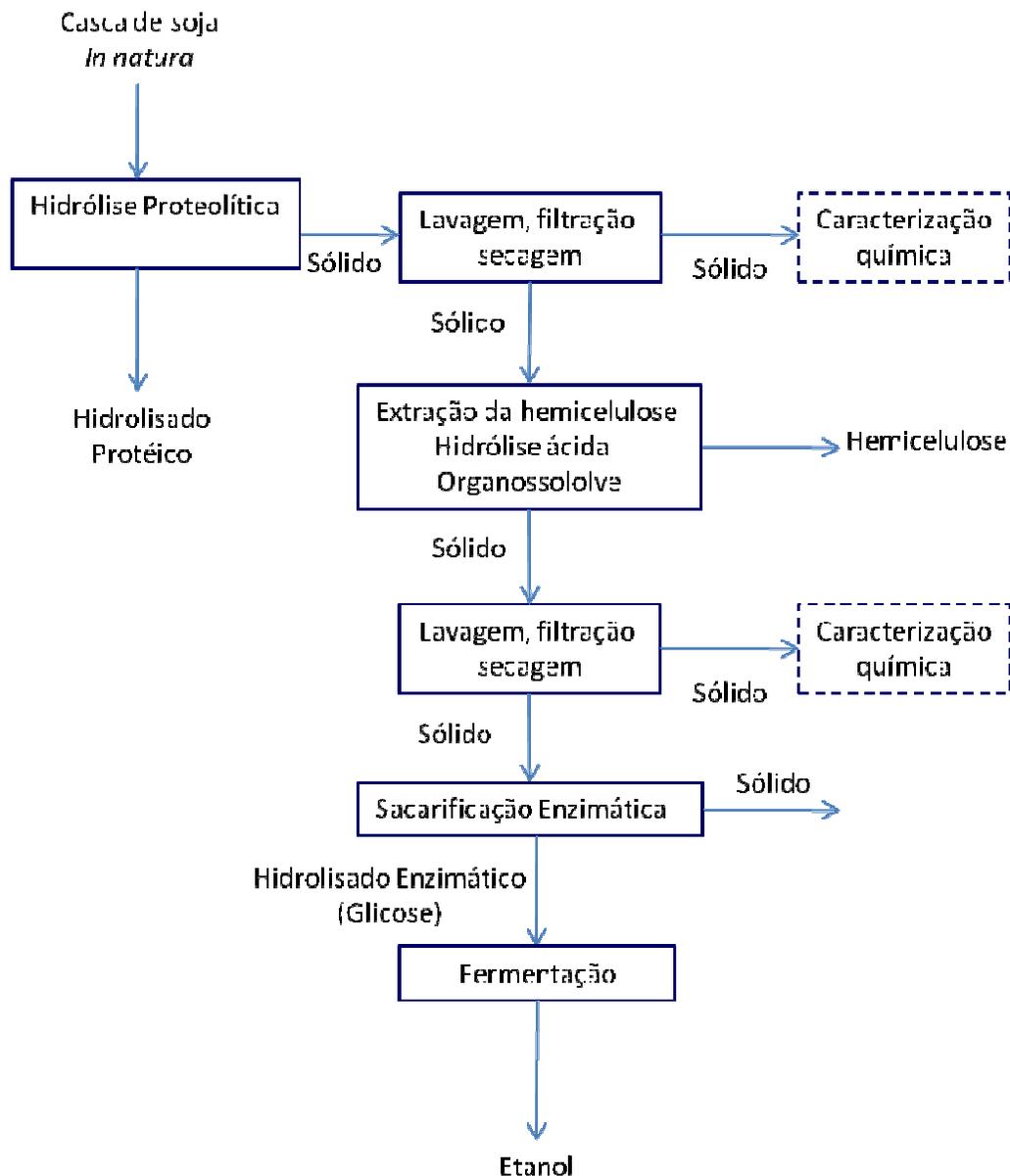
Para a quantificação das composições por faixa molecular das proteínas hidrolisadas usou-se o método descrito por Gupta (1983) e sugerido por Isaac Ashie (PhD da Novozymes, EUA), que consiste em considerar a área do cromatograma diretamente proporcional à concentração de proteínas e peptídeos

presentes na amostra. Assim, foi necessário conhecer o tempo de retenção dos padrões citados na Tabela 3.1 para estabelecer a faixa de tamanho molecular de cada fração no cromatograma da amostra. Conhecendo-se a concentração total de proteínas na amostra, supõe-se que o percentual em área é equivalente ao percentual em massa de proteínas e/ou peptídeos.

3.2.5 Tratamento da casca de soja – Hidrólise proteolítica, remoção de hemicelulose, hidrólise celulolítica e fermentação alcoólica

Neste trabalho, foram avaliadas diferentes condições de hidrólises proteolíticas e pré-tratamentos da casca de soja visando à produção de etanol e oligopeptídeos. A Figura 3.1 mostra um fluxograma com as principais etapas envolvidas neste estudo, considerando os compostos e frações de interesse em cada etapa.

Figura 3.1 - Fluxograma da metodologia empregada para o estudo da casca de soja



3.2.6.1 Hidrólise Proteolítica

A hidrólise das proteínas da casca de soja foi inicialmente realizada nas condições estabelecidas por Miranda (2012) para a hidrólise das proteínas do farelo de soja, catalisada pela endoprotease comercial Novo-Pro D[®] (Novozyme).

Uma massa de 40 g de casca in natura (base seca) foi suspensa em 450 mL de água destilada. A suspensão foi mecanicamente agitada (830 rpm) e

termostatizada a 60°C. Deixou-se estabilizar o pH (em torno de 5,6) e a temperatura do meio reacional por 30 min, e retirou-se uma alíquota de 5 mL para determinar as proteínas solúveis e o perfil peptídico das mesmas. Seguidamente, ajustou-se o pH para 9,0 usando uma solução de NaOH 5 molL⁻¹ e outra alíquota da fração líquida era coletada para quantificação de proteínas. Protease NOVO PRO-D® era adicionada à suspensão (1%, m/m, massa de enzima/massa de proteína) e o pH era monitorado e controlado em um titulador automático StatTitrimo modelo 718 (Metrohm Ltda, Suíça) por 5 h usando solução de NaOH 1molL⁻¹.

Ao final da hidrólise, a fração sólida era recuperada por filtração, lavada com aproximadamente 400 mL de água e seca por 24 h a 60°C. Em seguida, a fração sólida remanescente era pesada para se determinar o rendimento mássico (equação 3.9 a seguir) e a sua composição química (lignina, celulose, hemicelulose, proteínas). A fração líquida era usada para determinar o teor de proteínas solúveis e o perfil peptídico.

Hidrólises enzimáticas também foram realizadas com 2 e 4% (m/m, massa de enzima / massa de proteína presente na casca de soja) de Novo-Pro D® (nas condições descritas acima) e sequencialmente com quimotripsina (55°C e pH 8, de acordo com Tardioli, 2003) e Novo-Pro D® (60°C e pH 9,0), ambas a 1% (m/m). Foi realizado um ensaio nas condições descritas acima sem a adição da enzima (branco), afim de se determinar eventual solubilização de proteínas por hidrólise química.

3.2.6.2 - Extração de hemicelulose por hidrólise ácida suave

A extração de hemicelulose foi realizada por hidrólise ácida branda de acordo com metodologia descrita por Fogel et al. (2005) para o bagaço de cana.

Amostras de 20 g de casca de soja in natura e hidrolisadas por proteases eram colocadas em erlenmeyers de 500 mL e suspensas (razão 1:4, m/v) em 80 mL de ácido sulfúrico 3% (v/v).

Em seguida, o erlenmeyer contendo a mistura era tampado e autoclavado por 40 min a 120°C. Após a hidrólise, o material sólido era esfriado a temperatura ambiente, recuperado por filtração e lavado com água destilada até pH neutro. O volume do hidrolisado e da solução de lavagem eram medidos usando uma proveta de 1L, o material sólido era seco a uma temperatura de 60°C por 12 h e

posteriormente pesado para se determinar o rendimento mássico (Equação 3.9) do pré-tratamento ácido.

A fração sólida foi caracterizada quanto à composição lignocelulósica, proteica e umidade. O filtrado era analisado quanto à concentração de proteínas solúveis, hemicelulose (xilose, arabinose e glicose) e ácidos orgânicos.

O rendimento da extração de hemicelulose foi calculado usando a equação (3.9):

$$R_x = \frac{M_x}{M_{xT}} \times 100 \quad (3.9)$$

Onde M_x representa a massa de xilose obtida no hidrolisado e M_{xT} a massa de xilose presente no material antes da extração..

3.2.6.3 Extração de hemicelulose por organossolve

Casca de soja hidrolisada com Novo-Pro D® (1%, 60°C, pH 9,0) foi pré-tratada pelo método organossolve, o qual permite a remoção de xilose (na forma de xilooligomeros) e lignina, nas condições estabelecidas para o bagaço de cana por Wolf (2011).

Uma massa de 50 g de casca de soja hidrolisada (massa seca) e 500 mL de uma solução etanol-agua 50% (v/v) foram adicionados em um reator de alta pressão (PARR 4848) com capacidade de 5L. O pré-tratamento foi realizado a uma temperatura de 170°C por 60 min. Após o fechamento do reator e das válvulas de pressão, o reator foi ligado e o tempo de aquecimento monitorado até atingir-se a temperatura programada. A partir desse momento, iniciou-se a contagem do tempo de reação (60 min).

Após o tempo de reação desejado, a fração sólida foi separada do sobrenadante por filtração a vácuo, licor negro (filtrado) foi guardado e posteriormente analisado para determinar o teor de proteínas solúveis. O solido pré-tratado foi lavado duas vezes com 500 mL da solução etanol-agua (50%, v/v) a 60°C. Em seguida, lavou-se o material sólido com solução de NaOH 200 mmolL⁻¹ à temperatura ambiente. Para total remoção da lignina solubilizada, a biomassa foi transferida para um saco de tecido e lavada com água destilada até pH neutro e clarificação do líquido.

A casca de soja pré-tratada e neutralizada foi filtrada a vácuo para remoção máxima do líquido. Determinada sua umidade, a biomassa foi pesada para cálculo do rendimento mássico do pré-tratamento. Em seguida, o material foi guardado e posteriormente analisado quanto a sua composição química.

3.2.6.4 Cálculo do Rendimento Mássico

Os rendimentos mássicos das etapas de hidrólise proteica e remoção de hemicelulose por pré-tratamento ácido e organosolve foram calculados utilizando-se a equação (3.10).

$$\eta = \frac{m_{final}}{m_{inicial}} \times 100 \quad (3.10)$$

onde:

$m_{inicial}$: massa inicial seca de material lignocelulósico (g);

m_{final} : massa final seca de material lignocelulósico (g);

η : rendimento mássico da etapa.

3.2.6.5 – Hidrólise enzimática da celulose

Em um erlenmeyer de 250 mL foram colocados 3,0 g de casca de soja pré-tratada ou *in natura* (massa seca) e aproximadamente 30 mL de tampão citrato de sódio 50mmolL⁻¹, pH 4,8, mantendo fixa a relação (sólido-líquido) 1:10. As hidrólises foram realizadas sob agitação de 200 rpm em uma incubadora (MA 832 – Marconi) com temperatura controlada em 50°C (CARVALHO, 2011).

Para cálculo da conversão de celulose em glicose, alíquotas de 300 µL do meio reacional eram coletadas nos tempos 0, 3, 6, 24, 48 e 72 h. As amostras eram coletadas em tubos tipo Ependorf contendo 200 µL de NaOH 200mmolL⁻¹ para inativação das enzimas, sendo posteriormente diluídas e filtradas em membranas de 0,45µm. A concentração de glicose era determinada por CLAE nas condições descritas anteriormente. Ao final das hidrólises, o meio reacional era centrifugado a 2500 rpm, 4°C, por 10 min. A fração líquida sobrenadante, contendo glicose, era utilizada posteriormente para a fermentação alcoólica.

A conversão enzimática e a produtividade da celulose foram calculadas pelas seguintes equações (3.11):

$$x_g = \frac{M_g \cdot f_h}{M_i \cdot y_i} \times 100 \quad (3.11)$$

$$P_g = \frac{C_g}{t} \quad (3.12)$$

Onde

x_g = Conversão de glicose ;

M_g = massa de glicose presente no hidrolisado;

f_h = fator de hidrólise da celulose (0,9);

y_i = teor de celulose no material lignocelulósico;

M_i = massa seca inicial de material lignocelulósico;

C_g = concentração de glicose (g/L)

P_g = Produtividade de glicose (g/L.h).

Diferentes parâmetros foram avaliados na hidrólise enzimática da celulose, a saber:

- (i) Carga enzimática: casca de soja in natura e pré-tratadas foram hidrolisadas com duas concentrações de celulasas, 7 e 20 FPU por grama de celulose no material lignocelulósico, mantendo-se constante as outras condições da reação.
- (ii) Suplementação com β -glicosidase e pectinase: hidrólises com celulasas (melhor condição obtida em i) foram suplementadas com 20 UI de β -glicosidase por grama de celulose e/ou 1% (m/m) de pectinase. As demais condições reacionais foram mantidas constantes;
- (iii) Umidade da casca de soja pré-tratada: foram avaliadas as conversões de celulose em glicose utilizando-se casca de soja pré-tratada com 8 e 72% de umidade. As demais condições reacionais foram mantidas constantes.

3.2.6.6–Fermentação alcoólica

O licor sacarificado, resultante da hidrólise do resíduo lignocelulósico por celulasas, foi submetido a um processo de fermentação alcoólica usando a levedura *Sacharomyces Cerevisiae* (fermento fresco de panificação produzido pela Fleischmann) seguindo a metodologia utilizada por Wolf (2011).

Em um erlenmeyer de 500 mL foi preparado um inóculo da levedura contendo 200 mL de meio de cultivo (pH 4,8) com a seguinte composição: extrato de levedura (2 g/L), Na₂SO₄ (1 g/L), MgSO₄.7H₂O (0,25 g/L), ureia (2g/L), CaCl₂.2H₂O (0,5 g/L), K₂HPO₄ (0,5 g/L), Kamuran (4 g/L), glicose (20 g/L) e levedura (10 g/L, base seca). O inóculo foi mantido em uma incubadora (MA 830-Marconi) com agitação de 250 rpm a 30°C por 2 h. Após este período, o inóculo foi filtrado a vácuo e a massa de levedura foi usada para a fermentação do licor sacarificado.

Um volume de 15 mL do licor sacarificado (hidrolisado enzimático de casca de soja pré-tratada) foi utilizado na fermentação alcoólica, usando uma concentração de levedura 4 vezes inferior à concentração de glicose, mantendo-se constante as concentrações dos nutrientes citados anteriormente. As condições da fermentação eram as mesmas citadas acima, exceto o tempo de fermentação que era de 135 min. Para favorecer as condições anaeróbicas na fermentação alcoólica, os experimentos foram realizados em erlenmeyers de 50 mL.

Alíquotas de 300 µL do meio de fermentação eram coletadas em intervalos de 30 min para determinação do teor de etanol produzido e glicose consumida pelo microrganismo. As amostras eram diluídas e imediatamente filtradas em membranas de 0,45 µm para posterior análise por CLAE.

O rendimento real (R_f), rendimento com relação ao teórico e a produtividade foram calculadas usando as equações (3.13), (3.14) e (3.15).

$$R_f = \frac{\text{Etanol produzido}}{\text{glicose inicial}} \times 100 \quad (3.13)$$

$$R_{tf} = \frac{R_f}{0,51} \times 100 \quad (3.14)$$

$$P_{et} = \frac{C_{et}}{t} \quad (3.15)$$

Onde:

R_f =Rendimento real de etanol (%)

R_{tf} =Rendimento com relação ao teórico (%)

P_{et} =Produtividade de etanol (g/Lmin)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização química da biomassa lignocelulósica

A composição química da casca de soja depende geralmente do processamento do grão, das características do cultivo e da genética da soja. A IMCOPA, empresa fornecedora do material lignocelulósico usado neste trabalho, se dedica ao processamento de soja não transgênica desde 1998. A Tabela 1 ilustra a comparação de composições químicas desta biomassa lignocelulósica, obtidas no atual estudo e por outros autores reportados na literatura (MIELENZ *et al.*, 2009) e (CASSALES *et al.*, 2011).

Tabela 4.1 - Composição química percentual determinada para a casca de soja neste e em outros trabalhos reportados na literatura (MIELENZ *et al.*, 2009) e (CASSALES *et al.*, 2011)

Componente	Concentração (% m/m em BS)		
	Neste trabalho*	Mielenz et al, (2009)	Cassales et al, (2011)
Celulose	35,8 ± 0,6	29-51%	31%
Hemicelulose	23,1 ± 0,4	10 – 20%	26 %
Lignina solúvel em ácido	4,3 ± 0,3	2,8%*	5,7%
Lignina insolúvel	4,8 ± 1,0	Nd	3,4%
Extrativos	5,0 ± 1,0	Nd	3,2%
Cinzas	4,0 ± 0,3	1-4%	0,6%
Proteínas	15,4 ± 0,6	9-14%	13,1%
Pectinas	4,2 ± 0,2	6-15%	-
Total	96,6 ± 4,4		

* O valor corresponde a média de 3 repetições ± desvio padrão.

O valor encontrado de celulose em forma de glicose (35,8%) está dentro da faixa reportada na literatura pelos autores descritos anteriormente. As percentagens de hemicelulose, outro principal carboidrato polimérico constituinte da estrutura lignocelulósica, que durante a hidrólise ácida é convertido em seus açúcares monoméricos na forma de xilose (16,1%) e arabinose (4,8%), também foram próximos aos encontrados por Cassales *et al.* (2011). O teor de lignina (9,1%) obtido neste trabalho refere-se a lignina solúvel (4,3%) e insolúvel (5,8%) estão de acordo com o valor reportado por Cassales *et al.*, 2011. Os teores de açúcares presentes na casca de soja demonstram que esse material é uma boa alternativa

para a produção de etanol de segunda geração. O baixo conteúdo de lignina associado ao elevado teor de celulose em comparação a outros materiais lignocelulósicos, pode ser uma vantagem em termos de facilidade à hidrólise pelas enzimas celulases para a liberação dos açúcares fermentáveis. Além disso, o conteúdo de lignina presente no material poderá influenciar na etapa de fermentação dos açúcares, uma vez que a degradação deste composto aromático a derivados fenólicos conduzirá a possível inibição da levedura (WOLF, 2011).

A porcentagem de pectinas (4,2%), o terceiro carboidrato mais importante da parede vegetal, encontrada no material lignocelulósico estudado, estava próximo do valor reportado por Mielenz *et al*, 2009. Devido a sua ampla gama de usos industriais, o isolamento e caracterização deste composto presente na casca da soja tem sido objeto de estudo de diversos grupos de pesquisa (GNANASAMBANDAM; PROCTOR, 1999; MONSOOR; PROCTOR, 2001)

Outra importante característica do resíduo estudado, que o diferencia de outros materiais como a madeira e o bagaço de cana de açúcar, por exemplo, é o alto teor de proteínas (15,4%). A recuperação dessas proteínas permitirá diversas aplicações, dentre elas a fabricação de ração animal e como substituinte de fontes de nitrogênio usadas na preparação de meios de cultura (CASSALES *et al.*, 2011). Nesse contexto, a utilização de endoproteases no processo de recuperação das proteínas da casca conduziria à redução na massa molecular das proteínas solubilizadas, gerando um hidrolisado protéico com composição controlada, havendo, portanto uma ampliação nas possíveis aplicações do produto.

As porcentagens de compostos de diferentes naturezas, agrupadas como extrativos e cinzas (5% e 4%, respectivamente), encontrados no material de estudo são comparáveis com os valores reportados por Cassales *et al* 2011, já que estes podem depender por exemplo das condições de extração alcoólica, do cultivo e da genética do material de estudo.

4.2. Remoção enzimática de proteínas da casca de soja

Para uma melhor compreensão da discussão dos resultados referentes à remoção enzimática de proteínas da casca de soja, esta seção foi dividida em três partes: análise dos resultados da hidrólise enzimática usando endoprotease Novo-ProD[®], seguindo melhores condições obtidas por Miranda (2012) durante a hidrólise

do farelo de soja; efeito da concentração de enzima sobre a hidrólise e por último os resultados obtidos usando uma endoprotease pura, quimotripsina, como catalisador.

4.2.1 Hidrólises alcalina e enzimática com 1% Novo-ProD®.

Para avaliar a remoção das proteínas presentes na casca da soja, foram realizados ensaios de solubilização da biomassa em diferentes condições. O pH de máxima atividade da endoprotease Novo-ProD® é alcalino. Visando separar o efeito da condição alcalina da ação enzimática, foram realizados três conjuntos de experimentos: um primeiro, onde se adicionava a casca à água a 60°C, a seguir, ajustava-se o pH para 9,0 com NaOH 5M e adicionava-se a enzima; um segundo, onde se adicionava a casca à água a 60°C, esperava-se atingir pH constante (5,6), a seguir ajustava-se o pH para 9,0 com NaOH 5M e adicionava-se a enzima e, um terceiro, nas mesmas condições do segundo mas sem adição de enzima (branco). As Tabelas 4.2 e 4.3 ilustram os resultados da análise da fração líquida, onde se quantificou as proteínas pelo método de Kejdahl e a composição mássica percentual em termos de faixa de massa molecular,

Tabela 4.2 – Percentuais mássicos de proteína de casca de soja encontrada na fração líquida após contato da casca com água a 60°C, com e sem adição de enzima (a pH 9,0) em relação ao máximo teórico (solubilização de toda as proteínas presentes na casca).

	% Mássica de proteína solúvel		% Aumento de proteína solubilizada	
	Branco	Enzima	Branco	Enzima
pH inicial 5,6	23,1	23,1		
pH 9,0 t=0	43,5	43,4	20,4%	20,4%
Após 5 horas	45,6	56,9	2,2%	13,5%
Ajuste imediato a pH 9, com adição de enzima, 5 h		56,9		-

Os resultados mostrados na Tabela 4.2 indicam que ocorre remoção de proteínas solúveis pelo simples contato com água a 60°C, situação essa onde o pH se estabiliza em 5,6. Possivelmente, essa proteína já estava na forma solúvel, pois não se espera hidrolisar proteínas em condições tão brandas.

A elevação do pH para 9, faixa já alcalina, levou ao aumento no teor de proteínas. Extração alcalina é um dos métodos comumente usados para remoção de proteínas (SAUNDERS et al., 1975; CONNOR et al., 1976). Contudo, essa extração ocorre a pH 12, com NaOH 3 M, com 1 hora de contato, condições portanto muito mais drásticas que as utilizadas aqui. Possivelmente essa outra fração extraída devia estar fisicamente agregada e/ou ligada ao material sólido através de forças intermoleculares fracas (ligações de hidrogênio, iônica, etc.), que foram rompidas com o aumento do pH.

A hidrólise proteolítica com 1% de Novo-ProD® somente elevou a extração protéica em 10%, indicando dificuldade de acesso das proteases às cadeias de proteínas da casca de soja. Contudo, uma vez extraído, seja pela ação alcalina, seja pela ação enzimática, espera-se que a hidrólise enzimática continue e reduza em muito a massa molecular dessas proteínas, obtendo-se a maior parte delas na faixa abaixo de 5 KDa.. A Tabela 4.3a e Figura 4.1. mostram distribuição de tamanho das proteínas extraídas nas diferentes condições testadas. A figura 4.1 apresenta um conjunto de cromatogramas obtidos nas análises de CLAE dos hidrolisados de proteínas da casca de soja após solubilização da biomassa em pH 5,6, após atingir pH 9 (t=0), após 5 h com adição da endoprotease Novo-ProD®, um branco (na ausência de enzimas) nas mesmas condições.

Figura 4.1 - Cromatogramas de separação dos peptídeos da casca de soja hidrolisadas em diferentes condições. (a) Hidrolisado pH 5,6, T=60°C, t=0h; (b) Hidrolisado T=60°C, pH 9, t = 0h; (c) Hidrolisado 1% Novo-ProD, 3,90 g/L, T=60°C, pH 9, t = 5h (d) Hidrolisado sem enzima (Branco, 3,2g/L.T=60°C, pH 9, t=5h.

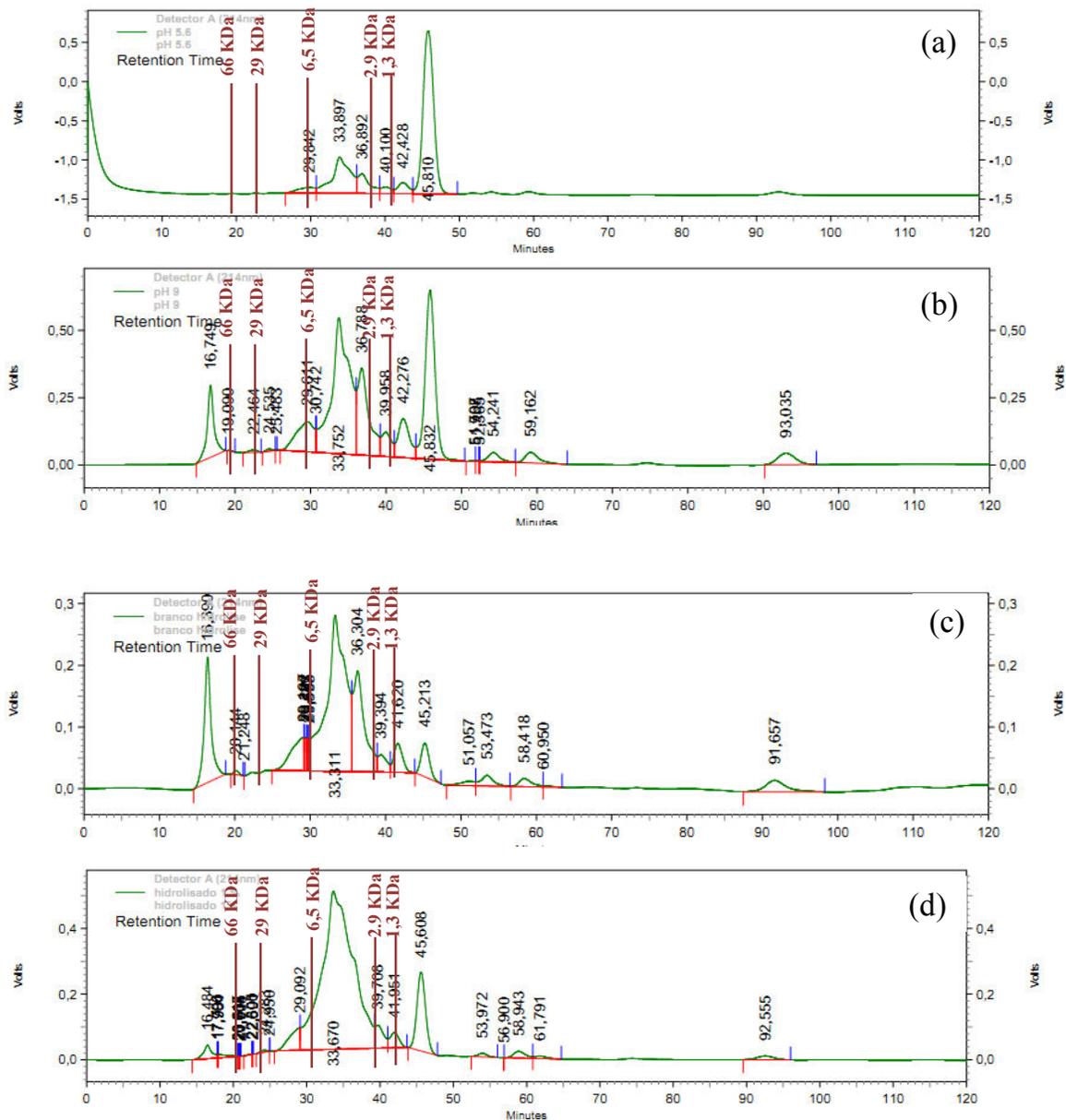


Tabela 4.3a – Composição por faixa molecular das proteínas encontrada na fração líquida após contato da casca com água a 60°C, pH 5,6 e a pH9,0, inicial e após 5 horas com e sem adição de enzima (branco).

Faixa de tamanho Molecular	Composição por faixa de massa molecular (%)				
	pH 5,6	pH 9, t=0	Branco t=5h	1% Novo-ProD t=5h	
				ajuste imediato pH	após atingir 5,6
mm> 67 Kda	0	7,0	10,7	1,9	1,9
67 KDa<mm<29KDa	2,3	3,4	3,8	1,5	1,5
29 KDa <mm<6,5 Kda	4,5	7,8	10,4	10,4	10,4
6,5 KDa <mm< 2,9 Kda	17,4	36,8	46,9	60,7	60,7
2,9 KDa <mm< 1,3 Kda	5,4	9,9	9,4	9,0	9,0
mm< 1,3 Kda	70,2	35,0	18,9	16,5	16,5

A Tabela 4.3b mostra valores de massas extraídas em cada faixa de massa molecular para os extratos analisados, uma vez que a concentração total de proteína em cada extrato submetido à análise CLAE era diferente.

Tabela 4.3b – Massas extraídas (g) nas diferentes faixas de massa molecular das proteínas encontradas na fração líquida após contato da casca com água a 60°C, pH 5,6 e a pH9,0, inicial e após 5 horas com e sem adição de enzima (branco).

Faixa de tamanho Molecular	massa (g)				
	pH 5,6	pH 9, t=0	Branco t=5h	1% Novo-ProD t=5h	
				ajuste imediato pH	após atingir 5,6
mm> 67 Kda	0,00	0,19	0,30	0,11	0,11
67 KDa<mm<29KDa	0,03	0,09	0,11	0,08	0,08
29 KDa <mm<6,5 Kda	0,06	0,21	0,29	0,40	0,39
6,5 KDa <mm< 2,9 Kda	0,25	0,99	1,32	0,78	0,76
2,9 KDa <mm< 1,3 Kda	0,08	0,27	0,26	0,78	0,76
mm< 1,3 Kda	1,00	0,94	0,53	1,46	1,43
Total	1,43	2,69	2,82	3,60	3,52

Os resultados confirmam que as proteínas obtidas a pH 5,6 já deviam estar solúveis, pois se tem 93% delas abaixo de 6,5kDa. Uma outra explicação possível para a expressiva presença de proteínas no líquido a pH 5,6 seria a presença de fertilizantes nitrogenados na casca de soja, que foram assumidos como nitrogênio protéico na análise Kjeldahl.

A pH 9,0, surge uma fração acima de 67KDa, que aumenta após 5 horas. Por outro lado, não há aumento na fração de proteínas de menores massas

moleculares, o que somente ocorre após adição da enzima, quando com certeza ocorrerá hidrólise de ligações peptídicas. Esses resultados corroboram a hipótese de que frações protéicas agregadas fisicamente estão se separando em unidades de menor massa molecular, já solúveis. A ação da enzima no tamanho das proteínas também fica clara, observando-se uma maior porcentagem mássica de proteínas na faixa abaixo de 6,5 KDa para o hidrolisado protéico (86%) do que para o hidrolisado alcalino (75%). Além disso, observa-se diminuição da fração entre 6,5 KDa <math><mm< 2,9</math> Kda e aumentos das frações entre 2,9 KDa <math><mm< 1,3</math> Kda aumento das frações 1,3 e <math><mm< 1,3</math> KDa, o que implica diminuição da alergenicidade das proteínas e aumento na digestibilidade.

A Tabela 4.4 apresenta os resultados, para ensaios em triplicata, da caracterização da casca de soja (fração sólida) após hidrólise, com e sem adição de protease, comparando-se com os obtidos para casca *in natura*. Na Tabela 4.5 são mostrados os resultados dos rendimentos mássicos, que permitem retornar à massa inicial e se comparar as perdas mássicas percentuais de cada componente. Os resultados para proteína nas frações sólidas confirmam os obtidos pelas análises das frações líquidas, com remoção de 58% da proteína inicial. Por outro lado, nota-se que na hidrólise enzimática

A Tabela 4.5 indica ainda que os cerca de 35% de celulose e 23% de hemicelulose presentes na casca de soja *in natura*, apenas cerca de 24% de celulose e 11% de hemicelulose permanecem na fração sólida, após 5 horas a pH 9,0 na ausência (branco) e na presença de enzima. No entanto, esta perda de carboidratos é devida ao fato de deixar estabilizar o pH após contato da casca da soja em água (atingindo pH 5.6 em 30 min), sendo observado que a celulose da casca da soja possui uma fração cristalina mais resistente à hidrólise e uma fração amorfa que é facilmente hidrolisada em pH ácidos (TAHERZADE; KARIMI 2008). Observa-se, contudo, que não há perda significativa de carboidratos no experimento onde o ajuste de pH foi imediato à adição da casca, seguido da adição da enzima, o que corrobora os resultados anteriormente explicados. Por tanto, se o produto desejado for hidrolisados proteicos com máxima pureza o mais indicado seria um ajuste imediato de pH a condição alcalina sem estabilização previa do pH (5.6), pois nesta condição tem-se solubilização de carboidratos.

Tabela 4.4 – Teores percentuais de proteína, celulose, hemicelulose e lignina na casca de soja in natura e nas frações sólidas após extração com e sem adição de proteases.

	%PROTEINA	%CELULOSE	%HEMICELULOSE	%LIGNINA
<i>In Natura</i>	15,4 ± 0,6	35,8 ± 0,6	23,1 ± 0,4	9,1 ± 1,2
Estabilização pH 5.6, 0,5h	12,5 ± 0,5	33,09 ± 1,8	17,2 ± 1,9	15,6 ± 1,5
Após Hidrólise proteolítica pH 9, 5h	8,7±0,2	33,1± 0,3	20,0± 0,5	7,9±1,7
Branco da hidrólise pH 9, 5h	9,3±0,8	36,1±0,1	22,2±0,03	16,2±1,2
Ajuste imediato a pH 9, com adição de enzima após 5h	8,7±0,2	43,2±0,7	23,1±0,6	9,6±1,3

Tabela 4.5 - Rendimentos mássicos* (η) após extração de proteínas com e sem adição de proteases e teores percentuais de cada componente, corrigidos levando-se em conta os rendimentos (massa de sólido após extração/massa inicial submetida à extração)

	η	PROTEINA (%)	CELULOSE (%)	HEMICELULOSE (%)	LIGNINA (%)
<i>In Natura</i>	1	15,4 ± 0,6	35,8 ± 0,6	23,1 ± 0,6	9,1 ± 1,2
Estabilização pH 5.6, 0,5h	0,79	9,9 ± 0,5	26,1 ± 1,8	13,6 ± 1,9	12,32 ± 1,5
Após Hidrólise proteolítica	0,75	5,9± 0,8	22,5± 0,3	13,6± 0,5	5,4± 1,7
Branco da hidrólise	0,68	6,3± 0,6	24,6± 0,7	11,3± 0,6	11,1±1,2
Ajuste imediato a pH 9, com adição de enzima após 5h	0,75	5,9± 0,8	32,4± 0,3	17,3± 0,3	7,2± 1,2

4.2.2 Efeito do aumento da concentração de enzima na extração de proteínas

Uma vez que a hidrólise enzimática já vinha sendo realizada nas condições ótimas de temperatura e pH (60°C, pH 9,0) (MIRANDA, 2012), decidiu-se testar o efeito do aumento na concentração de enzima nos rendimentos de remoção de proteínas. Foram, para isso, realizados ensaios com 2% e 4% de catalisador, mantendo-se fixas as outras condições. Os valores de massa de proteínas removidas da casca de soja e determinadas na fração líquida após hidrólise com 2 e 4% do catalisador foram 69,7 e 72%.

A Tabela 4.6 apresenta a composição química da fração sólida após hidrólise enzimática com diferentes concentrações de catalisador. Na Tabela 4.7 são apresentadas as composições corrigidas pelo rendimento mássico da hidrólise enzimática. Nota-se que um aumento de enzima de 1% para 2% produziu um aumento das proteínas totais removidas da casca de soja in natura para 74%, ao invés de 56,9% de proteínas totais solubilizadas usando 1% de catalisador. No entanto, já com a adição de 4% de catalisador a remoção de proteínas não teve um aumento significativo em comparação com a hidrólise realizada usando 2% de Novo-ProD[®]. Esses valores confirmam os determinados na fração líquida. Extração de proteínas usando 2% de Novo-ProD[®] vê-se, pois, como uma boa estratégia para remoção de proteínas da casca de soja.

Tabela 4.6 - Composição química da casca de soja in natura e das frações sólidas obtidas após extração de proteínas com diferentes concentrações de catalisador Novo-ProD[®].

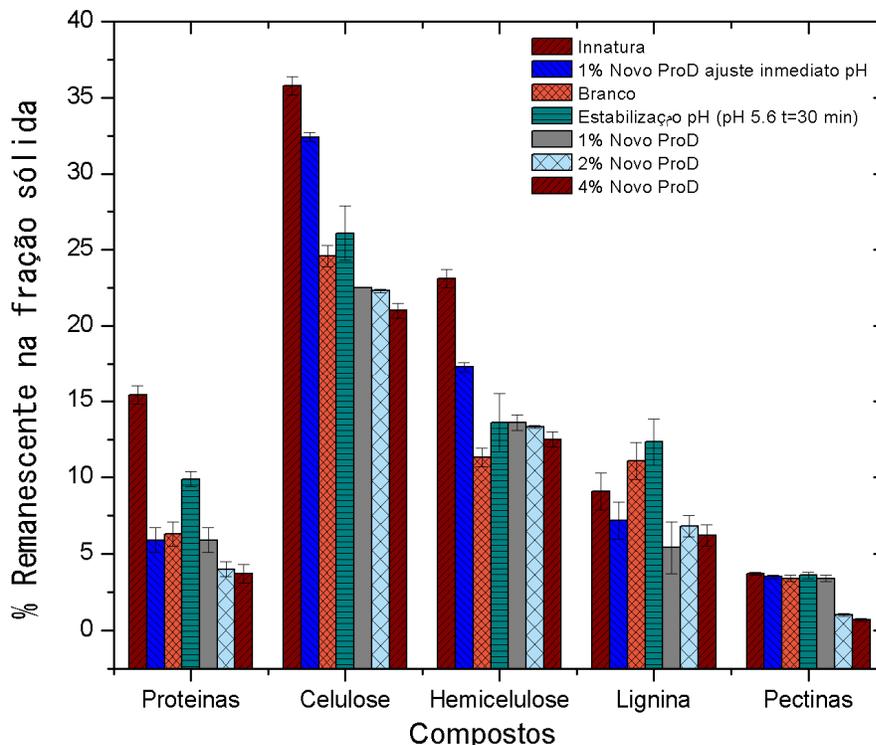
	PROTEINA (%)	CELULOSE (%)	HEMICELULOSE (%)	LIGNINA (%)	PECTINAS (%)
<i>In Natura</i>	15,4 ± 0,6	35,8 ± 0,6	23,1 ± 0,4	9,1 ± 1,2	3,7 ± 0,1
1% Novo-ProD	8,7±0,2	33,1± 0,3	20,0± 0,5	7,9±1,7	4,5± 0,1
2% Novo-ProD	6,2±0,5	35,2±0,3	20,7±0,1	10,8±0,7	1,5 ± 0,1
4% Novo-ProD	6,0±0,6	34,1 ±1,1	20,2±0,5	10,1±0,7	1,2 ± 0,1

Tabela 4.7 - Rendimentos mássicos (η) após extração de proteínas com e sem adição de proteases e composição químicas percentuais calculadas relativas à massa inicial submetida à extração

	η	PROTEINA (%)	CELULOSE (%)	HEMICELULOSE (%)	LIGNINA (%)	PECTINAS (%)
<i>In Natura</i>	1	15,4 ± 0,6	35,8 ± 0,6	23,1 ± 0,6	9,1 ± 1,2	3,7 ± 0,1
1% Novo-ProD	0,75	5,9± 0,8	22,5± 0,3	13,6± 0,5	5,4± 1,7	3,4± 0,2
2% Novo-ProD	0,64	4,0±0,5	22,3±0,3	13,3±0,1	6,8±0,7	1,0 ± 0,1
4 % Novo-ProD	0,62	3,7 ±0,6	21,0 ±1,1	12,5±0,5	6,2±0,7	0,7 ± 0,1

È importante, contudo, observar também que, conforme esperado, os únicos componentes cujos percentuais na fração sólida após remoção foram significativamente sensíveis (considerando-se o erro experimental) ao aumento de concentração da Novo-ProD[®] foram proteínas e pectinas (figura 4.2), devido ao aumento da concentração das proteases e pectinases.

Figura 4.2- Valores percentuais dos componentes do complexo lignocelulósico remanescentes nas frações sólidas da casca de soja *in natura* e após diferentes tratamentos: a) *In natura*; b) hidrólise proteolítica com 1% de Novo-ProD® com ajuste imediato de pH c) pH 9,0, 5h (branco); d) hidrólise proteolítica com 1% de Novo-ProD®; e) hidrólise proteolítica com 2% de Novo-ProD®; f) hidrólise proteolítica com 4% de Novo-ProD®.



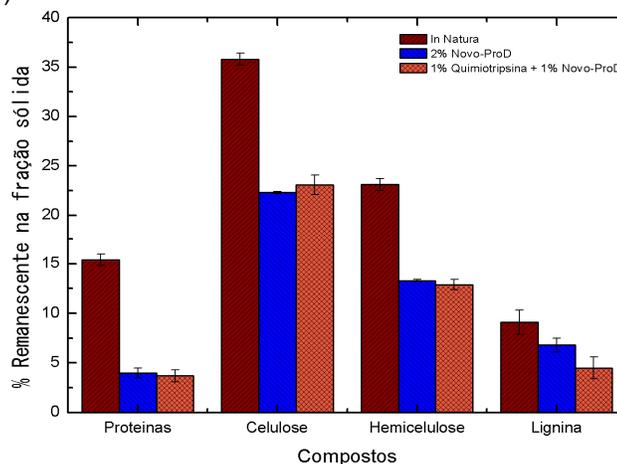
4.2.3 Hidrólise enzimática usando Quimotripsina.

Endoproteases possuem diferentes especificidades. Quimotripsina é uma endoprotease altamente específica que hidrolisa ligações peptídicas contendo resíduos hidrofóbicos no lado carboxílico da ligação, em especial os aromáticos, que são os mais hidrofóbicos. Foi reportado na literatura (Da-SILVA et al, 1997) que os resíduos aromáticos (tirosina, triptofano) das proteínas têm tendência a formar ligações cruzadas com os compostos fenólicos da parede celular. Decidiu-se por isso estudar a ação de 1% dessa enzima na remoção das proteínas da casca de soja. A dosagem de proteínas solúveis presentes no hidrolisado protéico obtido (usando o método de Kejdahl), mostrou que apesar da hidrólise ser altamente específica em comparação à hidrólise com Novo-ProD®, houve uma expressiva solubilização; 44% das proteínas da casca *in natura* em 5 horas. Optou-se, por isso, por realizar uma segunda hidrólise consecutiva à realizada com 1% de Novo-ProD® para remoção máxima de proteínas. Essa estratégia permitiu solubilizar 77% da proteína inicial, resultado semelhante ao obtido usando 2% de Novo-ProD® (74%)

para o mesmo tempo de hidrólise. Esse valor parece estar próximo do máximo que se pode extrair de proteínas da casca.

Na figura 4.3 são comparadas as percentagens de remoção de cada um dos outros componentes quantificados na fração sólida, relativamente à presente na casca *in natura*, para a hidrólise consecutiva com as duas enzimas e para hidrólise com Novo-ProD® 2%..enzimática. Observa-se que as perdas dos carboidratos (hemicelulose e celulose) foi semelhante em ambas as hidrólises, mas que as duas hidrólises consecutivas permitiram uma maior remoção da lignina. Esse resultado confirma a existência de interação entre resíduos de proteína e lignina, pois deve ter ocorrido desestruturação da macromolécula da lignina permitindo uma maior remoção desse componente. O uso conjunto das duas endoproteases, com maior remoção de lignina da fração sólida, pode ser interessante para melhorar a etapa seguinte de hidrólise enzimática de celulose, visando produção de etanol. Conforme esperado, houve remoção muito maior de pectinas com Novo-ProD® 2%, já que esse extrato enzimático não é puro e contém, além de endoprotease, também pectinase.

Figura 4.3 – Valores percentuais dos componentes do complexo lignocelulósico remanescentes nas frações sólidas da casca de soja *in natura* e após diferentes tratamentos: a) *In natura*; b) hidrólise proteolítica com 2% de Novo-ProD® c) as consecutivas usando 1% de quimotripsina (55°C, 5 h, pH 8,0) seguida da hidrólise com 1% de Novo-ProD® (60°C, 5 h, pH 9,0)



4.3. Efeito da hidrólise ácida branda na remoção de componentes da casca de soja

A ação catalítica de ácidos em ligações glicosídicas e peptídicas já é amplamente conhecida. Também é sabido que, devido à presença de ramificações nos heteropolímeros que as compõem, hemiceluloses são mais sensíveis à hidrólise ácida que celulose. Assim, submeter o material lignocelulósico a hidrólise ácida branda, com o propósito de remover apenas hemicelulose e tornar a celulose mais acessível ao ataque enzimático é metodologia amplamente utilizada nos estudos reportados na literatura para produção de etanol de lignocelulósicos. Decidiu-se assim testar também esse método para produção de etanol a partir da fração sólida da casca de soja, após remoção de proteínas. Assim, as frações sólidas resultantes das hidrólises enzimáticas realizadas com 1%, 2% e 4% de Novo-ProD® foram submetidas a uma hidrólise ácida suave com H₂SO₄ 3%, por 20 minutos tempo, a 120°C, para remoção da hemicelulose. Contudo, a remoção concomitante de proteínas na hidrólise ácida deveria também ser investigada. Assim, casca *in natura* foi também diretamente submetida a hidrólise ácida nas mesmas condições utilizadas anteriormente. As frações sólidas remanescentes da remoção da hemicelulose foram submetidas a lavagem com água destilada até atingir pH próximo a 6.

As Tabelas 4.8 e 4.9 comparam resultados da caracterização da casca de soja (fração sólida) após hidrólise ácida realizada como etapa sequencial à extração de proteína com adição de protease (1%, 2% , 4%), com os obtidos para hidrólise ácida realizada na casca *in natura*, com composições percentuais e levando-se em conta os rendimentos mássicos, para permitir comparação com teores presentes inicialmente no sólido. Nota-se que a hidrólise ácida sequencial às enzimáticas (1%, 2% e 4%) removeu 65,6%, 56,9%, 59,8% de hemicelulose respectivamente, principalmente na forma de xilose e arabinose cujo resultado concorda com as análises de carboidratos realizados nas frações líquidas, cujos resultados são mostrados na tabela 4.10.

Tabela 4.8 - Composições químicas percentuais das frações sólidas da casca de soja após hidrólise ácida seqüencial às hidrólises protéicas e diretamente da casca in natura

	Proteína (%)	Celulose (%)	Hemicelulose (%)	Lignina (%)	Pectinas (%)
<i>In Natura</i>	15,4 ± 0,6	35,8 ± 0,6	23,1 ± 0,4	9,1±1,0	4,2± 0,2
1% Novo Pro D	1,8 ± 0,1	48,4 ± 0,5	9,4 ± 0,2	11,1 ± 1,1	1,8 ± 0,1
2% Novo Pro D	3,2±0,5	49,1±0,6	12,9±0,2	23,0±0,3	0,5 ± 0,1
4 % Novo-ProD	2,8±0,1	49,1 ±0,4	12,0±0,5	18,0±1,9	1,33 ± 0,3
<i>In Natura</i> , após hidrólise ácida	4,1± 0,6	61,8± 0,6	9,1± 0,4	20,5± 1,2	0,3 ± 0,2

Tabela 4.9 -.Rendimentos mássicos* (η) e composições percentuais corrigidos da casca de soja após hidrólise ácida da biomassa in natura e de biomassas submetidas previamente à hidrólise protéica com diferentes concentrações de enzima. Composições químicas percentuais calculadas relativas à massa submetida à extração ácida

	η	PROTEINA (%)	CELULOSE (%)	HEMICELULOSE (%)	LIGNINA (%)	PECTINAS (%)
1% Novo-ProD®+ HA	0,74**	1,26 ± 0,1	35,8 ± 0,5	6,9 ± 0,2	8,2 ± 1,1	1,5± 0,1
2% Novo Pro D®+HA	0,68**	2,1±0,5	33,4± 0,6	8,8± 0,2	15,6± 0,3	0,3± 0,1
4% Novo-ProD®+ HA	0,68**	1,8 ±0,1	33,4± 0,4	8,2± 0,5	12,2± 1,9	0,9± 0,3
<i>In Natura</i>	1	15,4 ± 0,6	35,8 ± 0,6	23,1 ± 0,4	9,1±1,0	4,2± 0,2
Rota 2: <i>In Natura</i> + hidrólise ácida	0,4*	1,6 ± 0,3	24,8 ± 2,8	3,7 ± 0,6	8,2 ± 1,1	0,1± 0,1

*Em relação à casca in natura; ** Após hidrólise protéica

Tabela 4.10 - Composições químicas das frações líquidas obtidas após hidrólise ácida de casca de soja in natura e após ser submetida a hidrólise enzimática com diferentes concentrações de Novo-ProD®.

	Massa inicial casca BS (g)	Hidrolisado (L)	Xilose (g/L)	Arabinose (g/L)	HMF (g/L)	MF (g/L)	Proteínas (g/L)
1% Enzima+ HA	19,03	0,9	2,62	1,13	0,006	0,065	0,88
2% Enzima+HA	19,11	0,9	1,65	1,25	0,016	0,075	0,96
4% Enzima+ HA	19,05	0,9	1,63	1,21	0,016	0,02	1,07
<i>In Natura</i>	19,99	0,9	2,82	1,0	0,01	0,12	2,47

Os resultados obtidos na hidrólise ácida de casca *in natura* indicam que nas condições de hidrólise de ligações glicosídicas na hemicelulose, também são rompidas ligações peptídicas, já que também houve expressiva remoção de proteínas nessas condições. Observa-se que a hidrólise ácida apenas já é suficiente

para remoção de mais de 90% da proteína e mais que 80% da hemicelulose. Foram então determinadas as concentrações de aminoácidos livres no hidrolisado ácido e nas frações líquidas obtidas nas hidrólises enzimáticas com 1%, 2%, 4% de Novo-ProD®. Os resultados obtidos demonstraram que a hidrólise ácida levou a maior liberação de monômeros, obtendo-se maiores concentrações dos aminoácidos: ácido aspártico, ácido glutâmico, aspargina, glicina, prolina, confirmando que a hidrólise enzimática com endoproteases gera hidrolisados com melhores propriedades osmóticas, uma vez que são formados pequenos peptídeos, preferencialmente à monômeros.

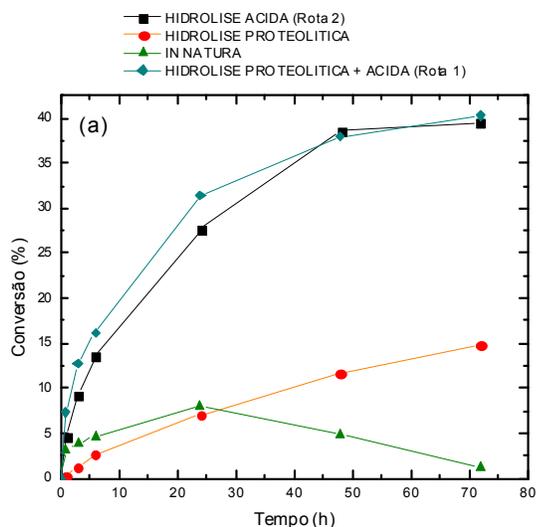
Na hidrólise ácida de casca *in natura* ocorre também perda expressiva de celulose, a qual não é observada ao se fazer a hidrólise ácida do material previamente submetido à extração enzimática de proteínas. Este comportamento pode ser explicado pela remoção da fração amorfa da celulose presente na casca de soja na condição de estabilização do pH antes da hidrólise proteolítica (atingindo pH ácido de 5,6), permanecendo no material sólido uma celulose cristalina de difícil acesso ao ataque ácido. A remoção de hemicelulose também é mais alta na casca *in natura* que após a extração enzimática de proteínas. Esses resultados indicam que também para a produção de etanol a melhor estratégia deve ser a remoção enzimática de proteínas seguida de remoção de hemicelulose, para evitar a perda de celulose.

4.4. Hidrólise enzimática da celulose e Fermentação

Para a obtenção dos açúcares fermentescíveis, a fração sólida da casca de soja *in natura* e pré-tratada com hidrólise enzimática (1% Novo-ProD), duas hidrólises consecutivas (enzimática e ácida suave) e hidrólise ácida da casca *in natura* foram submetidas a uma hidrólise enzimática da celulose, usando uma carga de 7FPU de Acellerase 1500® por grama de celulose presente no material pré-tratado.

A figura 4.4 mostra os perfis de hidrólises das amostras pré-tratadas e uma amostra de casca de soja *in natura*. Observou-se que, a partir de 48 horas de hidrólises, a conversão enzimática se estabilizava. Notou-se também o mesmo comportamento nas hidrólises pré-tratadas pelas duas rotas, obtendo-se conversões similares de aproximadamente 40%.

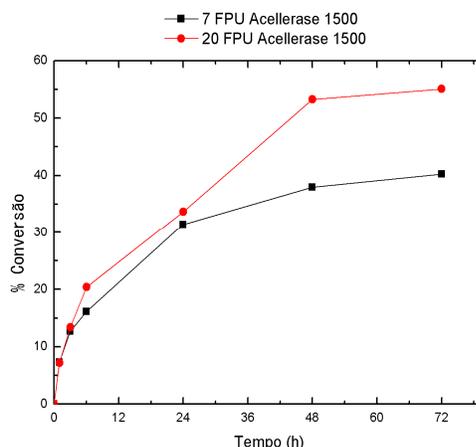
Figura 4.4 - Conversão de celulose em glicose em função do tempo para casca de soja in natura e submetida a diferentes pré-tratamentos, usando uma carga enzimática de 7 FPU por grama de celulose a 50°C, pH 4,8 por 72 horas.



A amostra pré-tratada só com a hidrólise proteolítica atingiu uma menor conversão (14,8%) devido ao alto teor de hemicelulose e lignina, que possivelmente estão impedindo acesso à celulose pelas enzimas. Já para casca *in natura* nota-se que atinge conversão similar à tratada enzimaticamente até 24h, com diminuição da concentração de glicose após esse tempo, o que deve estar sendo causado possivelmente pela ocorrência de reação de Maillard devido à presença de alta concentração de proteína na casca de soja. Um aumento na carga enzimática aumentaria a velocidade da reação diminuindo o tempo de hidrólise, o que foi feito a seguir.

Uma segunda etapa de hidrólise de celulose foi então estudada para a amostra pré-tratada com as hidrólises enzimática (1% Novo-ProD®) e ácida sequenciais, aumentando a carga enzimática de 7FPU a 20FPU nas mesmas condições (pH 4.8, 50°C e uma relação sólido líquido 1:10). A figura 4.5 mostra uma comparação dos perfis das hidrólises em 72 duas horas de reação. Pode-se observar que a partir de 6 horas de hidrólise a conversão da celulose a glicose usando 20 FPU foi maior, atingindo 55% de conversão em 72 horas o que representou um aumento de 16%..

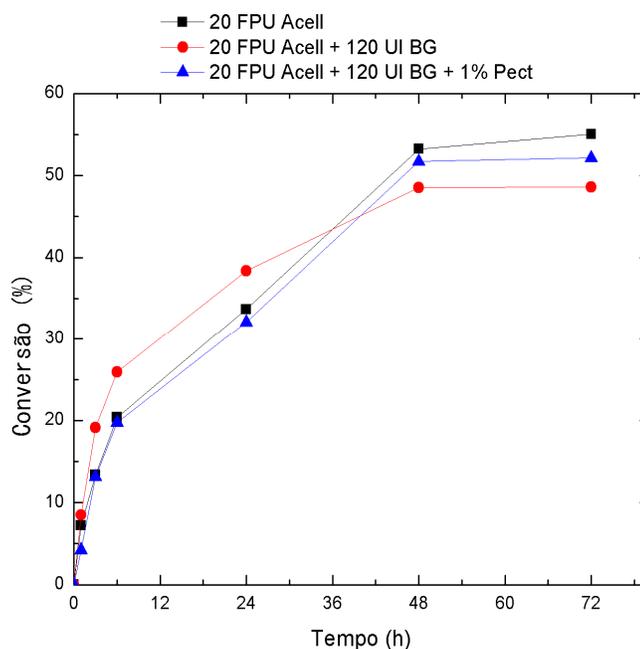
Figura 4.5 – Comparação dos perfis da conversão enzimática da celulose (%) com diferentes cargas de enzima 7 ou 20 FPU em relação ao tempo de hidrólise para amostras pré-tratadas com 1% de Novo-ProD® seguidas de hidrólise ácida suave.



A hidrólise de celulose é realizada em três etapas, requerendo no mínimo três diferentes enzimas. Na primeira etapa, uma endoglicanase rompe ligações Beta-glicosídicas internas da cadeia de celulose, gerando terminações. Na sequência, uma exoglicanase encontrando uma terminação inicia a liberação de duas unidades de glicose por vez (celobiose), sempre pela extremidade da cadeia. Finalmente, Beta-glicosidase rompe a ligação glicosídica de celobiose e gera duas moléculas de glicose. Essa última etapa costuma ser a limitante. Por outro lado, a presença de pectina na casca pode estar dificultando o acesso das celulases à celulose. Com o intuito de melhorar a conversão enzimática da celulose foram realizadas outras duas hidrólises suplementando a Acellerase 1500® com 120 UI de β -glicosidase e 1% de pectinase. A figura 4.6 mostra os perfis obtidos para as hidrólises. Pode-se observar que a adição de outras enzimas não levou a aumento na conversão de celulose em glicose. Uma possível explicação para esses resultados seria que a hidrólise não estava limitada pela etapa de conversão de celobiose em glicose, devido à já alta concentração de β -glicosidase no complexo enzimático Acellerase 1500®. A hidrólise parece assim estar limitada pelas duas primeiras etapas, ou seja, a endo e/ou exoglicanase estão se inativando no meio reacional, possivelmente se adsorvendo em lignina, uma vez que nenhum dos pré-tratamentos utilizados visavam a extrair esse componente. A presença de hemicelulose remanescente também pode estar dificultando o acesso das enzimas à celulose. Visando elucidar esse ponto, a casca de soja, após remoção de proteínas,

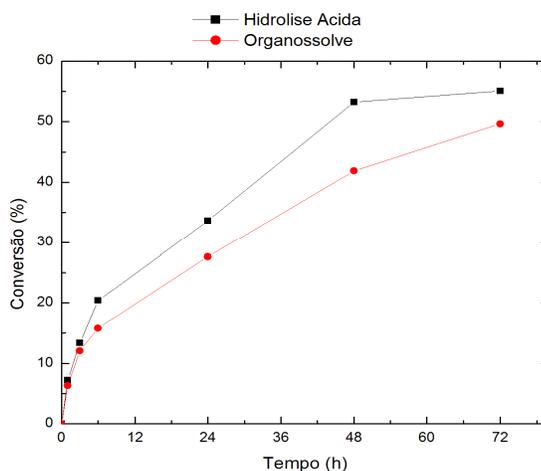
foi também submetida a tratamento organossolve com etanol, em condição reportada como de melhor remoção para bagaço de cana de açúcar (170°C, Etanol 50%, 60 min). O tratamento organossolve visa principalmente remoção de lignina, uma vez que essa hidrofóbica macromolécula é solúvel em solvente orgânico a quente. As duas frações sólidas obtidas após os dois tratamentos foram a seguir submetidas a hidrólise enzimática com celulases (20 FPU/g celulose).

Figura 4.6 – Perfis da conversão enzimática da celulose (%) em relação ao tempo de hidrólise, suplementando o complexo enzimático Acellerase 1500 com β -glicosidade e pectinase usando como substrato amostras pré-tratadas com 1% de Novo-ProD® seguidas de hidrólise ácida suave.



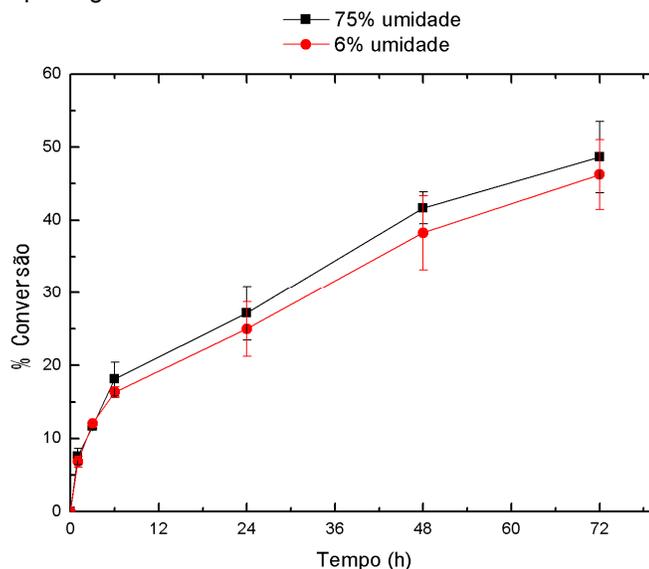
A figura 4.7 mostra os perfis de hidrólise de casca de soja submetida previamente a hidrólise ácida e a tratamento organossolve. Os resultados obtidos indicam que nas primeiras 60 horas a hemicelulose parece ser o fator mais importante, pois as conversões são mais altas no material em que se removeu mais hemicelulose do que para o material pré-tratado com água-etanol a quente. Contudo, a figura também mostra que enquanto a hidrólise do primeiro parece já estar cessando após 60 horas, no segundo-organossolve, a reação continua a ocorrer com alta velocidade indicando que a remoção de lignina talvez permita se atingir conversões maiores que no material tratado com ácido. Esse ponto, contudo, precisa ser melhor investigado.

Figura 4.7 – Comparação dos perfis da conversão enzimática da celulose (%) em relação ao tempo de hidrólise, das amostras pré-tratadas com 1% de Novo-ProD® seguidas de hidrólise ácida suave e organossolve.



O resultado da hidrólise da celulose em 72 horas para a amostra pré-tratada por organossolve (170°C, 60 min, etanol 50%) foi semelhante ao resultado obtido nas mesmas condições de hidrólise por Wolf 2011, (50°C, pH 4,8, 20 FPU Acellerase 1500) para o bagaço de cana moído a 20 mesh (27,0 g/L), atingindo uma concentração de 27,5 g/L de glicose. No entanto, a concentração de glicose no hidrolisado, poderia ser melhorada diminuindo o impedimento estérico causado pela presença da lignina e hemicelulose residual. Assim, diferentes estratégias poderiam ser utilizadas para melhorar o rendimento da remoção de hemicelulose e lignina residual. O tratamento organossolve, por exemplo, pode remover lignina e parte de hemicelulose. A adição de pequena concentração de ácido no tratamento organossolve permite aumentar ainda mais a remoção desses componentes. A extensão da secagem do material após pré-tratamento também pode afetar a estrutura física e influenciar na conversão em glicose. Visando elucidar esse ponto, a casca de soja pré-tratada (Organossolve) e seca (aproximadamente 8% de umidade) e a casca úmida após pré-tratamento (72% umidade) foram submetidas à hidrólise mantendo-se constantes as outras condições (50°C, 20 FPU Acellerase 1500, 200 rpm, 1:10 sólido-líquido).

Figura 4.8 – Conversão enzimática da celulose (%) em relação ao tempo de hidrólise, com diferentes umidades iniciais das amostras pré-tratadas com 1% de Novo-ProD® seguidas de hidrólise por organossolve.



A figura 4.8 apresenta os perfis das hidrólises da celulose da casca de soja seca e úmida após pré-tratamento organossolve. O comportamento similar das figuras mostra que não há influência da umidade inicial do material na sacarificação enzimática, não sendo necessária assim uma etapa de secagem antes da hidrólise da celulose, a qual ocasionaria um maior consumo de energia no processo global. No entanto, o perfil da conversão enzimática se mostrava ainda crescente em 72 horas para as duas condições testadas, evidenciando possivelmente uma necessidade de maior tempo de hidrólise.

Os hidrolisados enzimáticos obtidos a partir da hidrólise do material lignocelulósico pré-tratado com Novo Pro-D 1% e hidrólise ácida suave foram submetidos à etapa de fermentação pela levedura *Saccharomyces cerevisiae*. As Tabelas 4.11a e b mostram resultados obtidos na hidrólise e fermentação, respectivamente desses materiais em função do tempo. A Tabela 4.12 compara resultados obtidos para os diferentes materiais em 72 horas

A figura 4.9 mostra os perfis do consumo de glicose e produção de etanol (g/L) em função do tempo para casca de soja pré-tratada e sacarificada de acordo com a numeração da tabela 4.11. Nota-se que o processo fermentativo se mostrou satisfatório em todos os casos obtendo-se rendimentos acima de 85% em relação ao teórico. A máxima concentração de etanol obtida para a casca pré-tratada com 1% de Novo Pro-D® foi de 12,8 g/L, similar à obtida com casca in natura submetida a hidrólise ácida, que produziu uma concentração de 13,45 g/L. A

remoção das proteínas para posterior aproveitamento não influencia, portanto, no desempenho da hidrólise e fermentação..

Tabela 4.11 – Concentrações de glicose (Cg) e de etanol (Cet), conversão, produtividade e rendimento em etanol em 72 h no processo de hidrólise e fermentação por *S.cerevisiae*, para diferentes condições de pré-tratamento da casca de soja..ocesso fermentativo. $X_{c/g}$ = conversão celulose/glicose; Pr_g = produtividade em glicose; $X_{g/et}$ = conversão glicose/etanol; Pr_{et} = produtividade em etanol; η_{et} = rendimento em etano em relação ao teórico

Hidrolisado	Pré-tratamentos e condições de sacarificação	Cg, 72 h (g/L)	$X_{c/g}$, 72 h (%)	Cet, 72 h (g/L)	γ_{et} (%)
[a]	1% Novo Pro-D® H. Ácida (3% H ₂ SO ₄), Sacarificação (7FPU Acellerase, pH 4,8, 50°C)	20,6	40,2	9,21	87,7
[b]	1% Novo Pro-D® H. Ácida (3% H ₂ SO ₄), Sacarificação (20 FPU Acellerase, pH 4,8, 50°C)	29,1	55	12,8	86,2
[c]	<i>In natura</i> H. Ácida (3% H ₂ SO ₄), Sacarificação (7 FPU Acellerase, pH 4,8, 50°C)	28,1	39,5	13,45	93,9

Figura 4.9 – Perfis da etapa de fermentação para os hidrolisados contidos na tabela 4.11

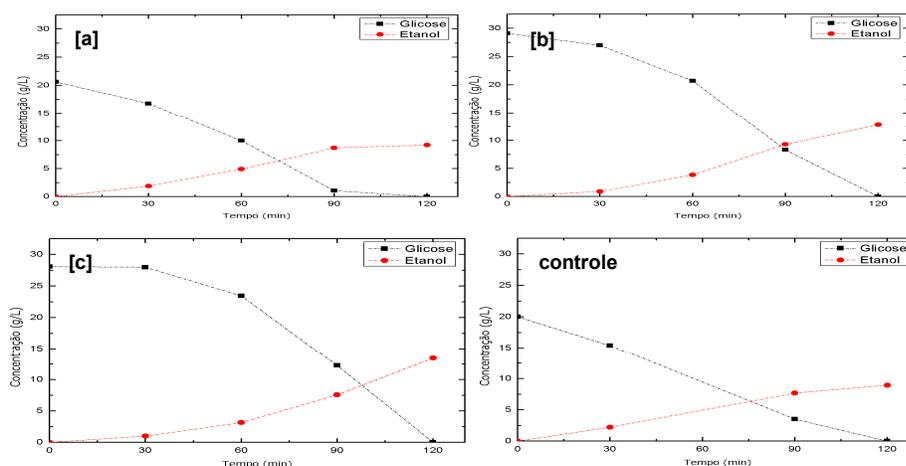


Tabela 4.12 – Conversão de celulose a glicose e concentração de glicose no hidrolisado em função do tempo para os materiais pré-tratados com 1% Novo Pro-D® seguida de H. Ácida (3% H₂SO₄) e da casca de soja *In Natura* hidrolisadas com diferentes cargas enzimáticas. X_{c/g} = conversão celulose/glicose; Pr_g = produtividade em glicose

Tempo	HIDROLISADOS								
	[a]			[b]			[c]		
	1% Novo Pro-D® H. Ácida (3% H ₂ SO ₄), Sacarificação (7FPU Acellerase, pH 4,8, 50°C)			1% Novo Pro-D® H. Ácida (3% H ₂ SO ₄), Sacarificação (20 FPU Acellerase, pH 4,8, 50°C)			<i>In natura</i> H. Ácida (3% H ₂ SO ₄), Sacarificação (7 FPU Acellerase, pH 4,8, 50°C)		
	Glicose (g/L)	X _{c/g} (%)	Pr _g (g/L.h)	Glicose (g/L)	X _{c/g} (%)	Pr _g (g/L.h)	Glicose (g/L)	X _{c/g} (%)	Pr _g (g/L.h)
0h	0	0,0	0	0	0	0	0	0	0
1h	3,74	7,3	3,74	3,8	7,1	3,75	3,2	4,5	3,20
3h	6,48	12,7	2,16	7,0	13,2	2,32	6,5	9,2	2,17
6h	8,24	16,1	1,37	10,6	20,1	1,77	9,6	13,6	1,61
24h	16,08	31,4	0,67	17,8	33,7	0,74	19,6	27,6	0,82
48h	19,42	37,9	0,40	28,1	53,2	0,59	27,4	38,6	0,57
72h	20,62	40,3	0,29	29,1	55,1	0,40	28,1	39,5	0,39

Tabela 4.13a – Concentração de glicose, de etanol, conversão glicose-etanol, rendimento em etanol (C_{etanol}/glicose consumida), produtividade em etanol (C_{etanol}/tempo), rendimento em relação ao teórico (rend/0,511) e produtividade, em função do tempo para o hidrolisado [a]. X_{g/et} = conversão glicose/etanol; Pr_{et} = produtividade em etanol

Tempo	Glicose (g/L)	Etanol (g/L)	X _{g/et} (%)	Pr _{et} (g/Lmin)	Rendimento (%)	Rendimento em relação ao teórico (%)
0	20,62	0	0,0	0,0	0,0	0,0
30	16,78	1,9	18,6	0,06	9,2	18,0
60	10,01	4,9	40,4	0,08	23,8	46,5
90	1,06	8,7	89,4	0,10	42,2	82,6
120	0,00	9,21	100,0	0,08	44,7	87,4

Tabela 4.13b – Concentração de glicose, de etanol, conversão glicose-etanol, rendimento em etanol (C_{etanol}/glicose consumida), produtividade em etanol (C_{etanol}/tempo), rendimento em relação ao teórico (rend/0,511) e produtividade, em função do tempo para o hidrolisado [b]. X_{g/et} = conversão glicose/etanol; Pr_{et} = produtividade em etanol

Tempo	Glicose (g/L)	Etanol (g/L)	X _{g/et} (%)	Pr _{et} (g/Lmin)	Rendimento (%)	Rendimento em relação ao teórico (%)
0	29,10	0	0,0	0,0	0,0	0,0
30	26,97	1,7	7,3	0,06	6,1	11,9
60	18,70	5,4	30,7	0,09	19,2	37,7
90	8,32	9,3	55,5	0,10	33,1	64,9
120	0,00	12,8	100,0	0,11	45,6	89,3

Tabela 4.13c – Concentração de glicose, de etanol, conversão glicose-etanol, rendimento em etanol ($C_{\text{etanol}}/\text{glicose consumida}$), produtividade em etanol ($C_{\text{etanol}}/\text{tempo}$), rendimento em relação ao teórico ($\text{rend}/0,511$) e produtividade, em função do para o hidrolisado [c].
 $X_{\text{g/et}}$ = conversão glicose/etanol; Pr_{et} = produtividade em etanol

Tempo	Glicose (g/L)	Etanol (g/L)	$X_{\text{g/et}}$ (%)	Pr_{et} (g/Lmin)	Rendimento (%)	Rendimento em relação ao teórico (%)
0	28,06	0	0,0	0,0	0,0	0,0
30	27,98	1,01	0,3	0,03	3,6	7,0
60	23,45	3,16	16,2	0,05	11,3	22,0
90	12,26	7,57	47,7	0,08	27,0	52,8
120	0,00	13,45	100,0	0,11	47,9	93,8

Tabela 4.13d – Concentração de glicose, de etanol, conversão glicose-etanol, rendimento em etanol ($C_{\text{etanol}}/\text{glicose consumida}$), produtividade em etanol ($C_{\text{etanol}}/\text{tempo}$), rendimento em relação ao teórico ($\text{rend}/0,511$) e produtividade, em função do tempo para um meio de cultivo controle com glicose (20 g/L) e demais nutrientes adicionados aos hidrolisados. $X_{\text{g/et}}$ = conversão glicose/etanol; Pr_{et} = produtividade em etanol

Tempo	Glicose (g/L)	Etanol (g/L)	$X_{\text{g/et}}$ (%)	Pr_{et} (g/Lmin)	Rendimento (%)	Rendimento em relação ao teórico (%)
0	20,06	0	0,0	0,0	0,0	0,0
30	15,40	2,22	23,2	0,07	11,1	21,7
60	3,52	7,69	77,1	0,13	38,3	75,0
120	0,00	8,84	100,0	0,07	44,1	86,2

Os resultados de hidrólise enzimática de celulose e fermentação indicam desempenho similar do processo em termos de produtividade, conversão e concentração atingida de etanol, para material previamente submetido a extração protéica, seguido de hidrólise ácida e para casca *in natura* submetida diretamente a hidrólise ácida, quando se utilizou a mesma concentração de celulases na hidrólise da celulose presente na fração sólida. Toda a glicose produzida foi convertida a etanol com rendimentos acima de 80%, o que indica baixa concentração de subprodutos gerados no pré-tratamento, confirmando os resultados obtidos na análise da fração líquida. Contudo, utilizando apenas os tratamentos enzimáticos para remoção de proteína seguido de hidrólise ácida para remoção de hemicelulose, a máxima conversão em glicose foi de 55% , devido possivelmente à adsorção das celulases em lignina. A remoção de hemicelulose e proteínas implicam concentração de lignina, o que se reflete negativamente na performance das celulases. Por outro lado, a Figura 4.7 mostra que a hidrólise do material submetido a tratamento organossolve após remoção enzimática de proteínas pode atingir conversões mais altas. Além disso, embora não tenha sido caracterizada a fração sólida após tratamento organossolve, resultados obtidos para bagaço de cana de açúcar nas

mesmas condições (WOLF, 2011) mostra que não há perda de celulose nessas condições. Esse tratamento talvez seja então mais indicado para se atingir uma maior conversão na hidrólise de celulose e, conseqüentemente, mais alta concentração de etanol na fermentação.

5 CONCLUSÕES

A caracterização química de casca de soja efetuada neste trabalho mostrou que o material é composto de $35,8 \pm 0,6$ % de celulose, $23,1 \pm 0,4$ % de hemicelulose, $9,1 \pm 1,0$ % de lignina, $5 \pm 1,0$ % de extrativos, $4\% \pm 0,3$ % de cinzas, $15,4 \pm 0,6$ % de proteínas e $4,2 \pm 0,2\%$ de pectinas.

Estudos de remoção enzimática de proteínas a pH 9,0, condição de máxima atividade da protease comercial Novo-ProD[®], mostra que já ocorre remoção de cerca de 45% de proteínas sem adição da enzima, devido possivelmente à liberação de proteínas ligadas fisicamente à estrutura do material lignocelulósico.

A adição de 1% Novo-ProD[®] por 5 horas eleva a remoção de proteínas para cerca de 57%, resultando num hidrolisado protéico com mais de 90% com massa molecular abaixo de 6,5KDa.

Aumento da concentração de Novo-ProD[®] para 2% eleva a extração para 74%, mas após novo aumento para 4% não se observou incremento significativo na remoção de proteínas.

Uso de uma segunda hidrólise consecutiva à realizada com 1% de Novo-ProD[®], usando com 1% de quimotripsina permitiu remover 77% de proteínas, indicando que esse valor deve estar próximo do máximo teor percentual de proteínas extraível da casca de soja enzimaticamente. Hidrólise com quimotripsina permitiu também maior remoção de lignina, o que indica haver interação entre esse componente hidrofóbico da casca de soja e resíduos hidrofóbicos das cadeias de proteínas, para os quais quimotripsina tem alta afinidade.

Hidrólise ácida branda de casca de soja *in natura* ou seqüencial à remoção enzimática de proteínas com 1%, 2% e 4% de Novo-ProD[®] indicou que o ataque ácido ocorre nas ligações glicosídicas e peptídicas, removendo cerca de 90% das proteínas e 70% de hemicelulose dos quatro materiais testados. Houve indicação também de que a estabilização do pH em 5,6 na hidrólise enzimática removeu a fração amorfa da celulose presente na casca de soja, permanecendo no material pré-tratado uma celulose cristalina com difícil aceso ao ataque ácido, uma vez que apenas para casca de soja *in natura* se observou perda expressiva de celulose na fração sólida com o ataque ácido. Os resultados indicam, portanto, que é

recomendável a remoção de hemicelulose por hidrólise ácida de modo seqüencial à remoção proteolítica das proteínas da casca de soja.

Hidrólise enzimática com celulasas Acellerase 1500, 7 FPU/gmaterial das quatro frações sólidas oriundas dos tratamentos proteolíticos/ácidos mostrou máximas conversões (atingidas em 48 horas) em torno de 40% para as frações sólidas obtidas por hidrólise ácida direta e seqüencial à proteolítica. A conversão máxima atingida em 72 horas de hidrólise da celulose da casca de soja tratada apenas com hidrólise proteolítica (sem hidrólise ácida) foi de 14,8% devido, possivelmente, ao alto teor de hemicelulose e lignina, que devem estar impedindo acesso à celulose pelas enzimas. Na hidrólise da celulose da casca *in natura* ocorreu redução na concentração de glicose com o tempo, devido, possivelmente a degradação desse material por reação com proteínas, presente em alto teor no material *in natura*.

Aumento da concentração de celulasas para 20 FPU/gmaterial para hidrólise de material tratado com 1% Novo-ProD[®] seguido de hidrólise ácida permitiu atingir conversão de cerca de 53% em 50 horas, observando-se apenas um pequeno aumento para 55% em 72 horas. Adição simultânea de β -glicosidase não aumentou a conversão, indicando não haver limitação do processo pela ação dessa enzima. O teor de umidade do material também não afetou a conversão celulose/glicose.

Comparação das hidrólises de celulose das frações sólidas após pré-tratamento com 1% de Novo-ProD[®] seguida de hidrólise ácida suave ou tratamento organossolve mostrou conversões similares em 72 horas, mas com velocidade de reação estabilizada para a fração ácida e ainda alta para a tratada com organossolve, devido possivelmente à maior remoção de lignina da segunda.

Os resultados de hidrólise enzimática de celulose e fermentação das frações sólidas obtidas para casca de soja submetida a extração protéica com 1% Novo-ProD[®], seguido de hidrólise ácida e para casca *in natura* submetida diretamente a hidrólise ácida, indicam desempenho similar do processo em termos de produtividade, conversão e concentração atingida de etanol, quando se utilizou a mesma concentração de celulasas na hidrólise da celulose presente na fração sólida. Toda a glicose produzida foi convertida a etanol com rendimentos acima de

80%, o que indica baixa concentração de sub-produtos gerados no pré-tratamento, confirmando os resultados obtidos na análise da fração líquida.

REFERENCIAS

- ALMEIDA, J. R. M. et al. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 82, n. 4, p. 340-349, 2007.
- ALVIRA, P. et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4851-4861, 2010.
- ARANTES, V.; SADDLER, J. N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. **Biotechnology for Biofuels**, v. 3, 2010.
- BAK, J. S. et al. Fungal Pretreatment of lignocellulose by *phanerochaete chrysosporium* to produce ethanol from rice straw. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 104, n. 3, p. 471-482, 2009.
- BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. **Biotechnology Advances**, v. 15, n. 3-4, p. 583-620, 1997.
- BLASI, D.A. et al. **Soybean hulls**: composition and feeding value for beef and dairy cattle. Manhattan: Kansas State University, 2000. 18 p.
- BULHÕES, Ronaldo. **Limites e possibilidades para a cultura de soja no Paraná**. 2007. 190 p. Tese (Doutorado em Economia). Instituto de Economia. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.
- CARVALHO, Mirella. **Estudo cinético da hidrólise enzimática de Celulose de bagaço de cana-de-açúcar**. 2011. 138 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.
- CASSALES, A. et al. Optimization of soybean hull acid hydrolysis and its characterization as a potential substrate for bioprocessing. **Biomass & Bioenergy**, v. 35, n. 11, p. 4675-4683, Nov 2011a.
- CAVALETT, Otávio. **Análise do ciclo de vida da soja**. 2008. 245p. Tese (Doutorando em Engenharia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.
- CHAVEZ, F.; DA LUZ, B.; CASTILHOS, Z. **Agrominerais para o Brasil**. Rio de Janeiro. CETEM, 2010.
- CHEN, W. H.; YE, S. C.; SHEEN, H. K. Hydrolysis characteristics of sugarcane bagasse pretreated by dilute acid solution in a microwave irradiation environment. **Applied Energy**, v. 93, p. 237-244, May 2012.
- COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO- CONAB**. Acompanhamento de safra brasileira: grãos, primeiro levantamento, janeiro 2012. Disponível em <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=547&t=>>>. Acesso em 23 de junho de 2012.

CONNOR, M.A.; SAUNDERS, R.M.; KOHLER, G.O. Rice bran protein concentrates obtained by wet alkaline extraction. **Cereal Chemistry**, v. 53, n. 4, p. 488-496, 1976.

CORREDOR, D. Y. et al. Enzymatic hydrolysis of soybean hulls using dilute acid and modified steam-explosion pretreatments. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 2, n. 1, p. 43-50, 2008

CURVELO, Antonio. **Processos de deslignificação organossolve**. 1992. 110p. Tese (Título de livre Docente)- Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1992.

COTTA, J., et al. Validação do método para determinação de nitrogênio Kjeldahl total. **Revista analítica**, nº. 26, 2007.

CUNNINGHAM, K. D.; CECAVA, M. J.; JOHNSON, T. R. Nutrient digestion, nitrogen, and amino acid flows in lactating cows fed soybean hulls in place of forage or concentrate. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 11, p. 3523-3535

DA-SILVA, R.; FRANCO, C.M.L.; GOMES, E. Pectinases, hemicelulases e celulases, ação, produção e aplicação no processamento de alimentos: revisão. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 2, p.249-260,. 1997.

DIAS, A. A. et al. Enzymatic saccharification of biologically pre-treated wheat straw with white-rot fungi. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 15, p. 6045-6050, Aug 2010

DORSA, R.. **Tecnologia de processamento de óleos e gorduras vegetais**. 3a edição, 2000

DUFF, S. J. B.; MURRAY, W. D. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. **Bioresource Technology**, v. 55, n. 1, p. 1-33, Jan 1996.

EMBRAPA. **EMBRAPA soja**. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/>>. Acesso em 21 de junho de 2012.

ERICKSON, D. R. et al. **Handbook of Soy Oil Processing and Utilization**. Saint Louis, AOCS & ASA, Sexta edição, Cap 2, pg. 13, 1992

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989.

FERREIRA, E. **Substituição parcial do milho pela casca de soja na alimentação de cordeiros da raça Santa Inês em confinamento**. 2008. 80p. Dissertação (Mestrado em agronomia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

FISCHER, Morten. **Limiting factors for the enzymatic accessibility of soybean protein**. 2006. 155p. Tese (doutorado em química dos alimentos)- Departamento de Agrotecnologia e Ciencia dos alimentos, Universidade de Wageningen, Holanda, 2006.

FOGEL, R. et al. Optimization of acid hydrolysis of sugarcane bagasse and investigations on its fermentability for the production of xylitol by *Candida guilliermondii*. **Applied**

Biochemistry and Biotechnology, v. 121, p. 741-752, 2005.

GALBE, M.; ZACCHI, G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. In: OLSSON, L. (Ed.). **Biofuels**. Berlin: Springer-Verlag Berlin, v.108, 2007. p.41-65. (Advances in Biochemical Engineering-Biotechnology).

GARLOCK, R. J. et al. Comparative material balances around pretreatment technologies for the conversion of switchgrass to soluble sugars. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 24, p. 11063-11071, 2011

GIBBS, B. F. et al. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. **Food Research International**, v. 37, n. 2, p. 123-131, 2004

GNANASAMBANDAM, R.; PROCTOR, A. Preparation of soy hull pectin. **Food Chemistry**, v. 65, n. 4, p. 461-467, 1999

GOUVEIA, E.; TRAJANO, R.; SOUTO-MAIOR, A. Validacao de metodologia para a caracterizacao quimica de bagaco de cana de acucar. **Quimica Nova**, v. 32, p.1500-1503, 2009.

GUILLOTIN S. **Studies on the intra- and intermolecular distributions of substituents in commercial pectins. 2005. 168p.** Teses (Doutorado). Wageningen University. The Netherlands, 2005.

GUPTA, B.B. Determination of native and denatured milk proteins by high-performance size exclusion. **Journal of Chromatography**, Bradford on Avon, v. 282, p. 463-475, 1983

HA, M. A. et al. Fine structure in cellulose microfibrils: NMR evidence from onion and quince. **Plant Journal**, v. 16, n. 2, p. 183-190, Oct 1998.

HALL, G. S. Wood - chemistry, ultrastructure, reactions - FENGEL, D, WEGENER, G. **Nature**, v. 310, n. 5977, p. 521-521, 1984

HERNANDEZ, I. P. et al. Dilute sulfuric acid hydrolysis of tropical region biomass. **Journal of Renewable and Sustainable Energy**, v. 4, n. 2, p. 9, 2012

HETTI Palonen. **Role of lignin in the enzymatic hydrolysis of lignocelluloses.** 2004. 84p. Tese (Doutorado em Tecnologia). University of Technology, Espoo, Finlandia, 2004.

HIMMEL, M. E. et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science**, v. 315, n. 5813, p. 804-807, 2007.

HUANG, R. et al. Bioconversion of lignocellulose into bioethanol: process intensification and mechanism research. **Bioenergy Research**, v. 4, n. 4, p. 225-245, 2011.

KARLSSON, J. et al. Enzymatic properties of the low molecular mass endoglucanases Cel12A (EG III) and Cel45A (EG V) of *Trichoderma reesei*. **Journal of Biotechnology**, v. 99, n. 1, p. 63-78, 2002

KARUPPUCHAMY, V.; MUTHUKUMARAPPAN, K. Extrusion pretreatment and enzymatic hydrolysis of soybean hulls. **Bioenergy Engineering Conference**, p. 15, 2009.

KENNEDY, J. F. Enzyme technology. In: REHM, H. J.; REED, G. **Biotechnology**. v. 7a. Weinheim: VCH., 761 p, 1987

KIM, S.; DALE, B. E. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. **Biomass & Bioenergy**, v. 26, n. 4, p. 361-375, 2004.

KUMAR, G. S. et al. Cellulolytic enzymes production from submerged fermentation of different substrates by newly isolated *Bacillus* spp. FME. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 52, n. 1, p. 17-21, 2009

KUMAR, P. et al. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 48, n. 8, p. 3713-3729, 2009.

KUMAR, R.; SINGH, S.; SINGH, O. V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 35, n. 5, p. 377-391, 2008

KUMAR, R.; WYMAN, C. E. Effects of Cellulase and Xylanase Enzymes on the Deconstruction of Solids from Pretreatment of Poplar by Leading Technologies. **Biotechnology Progress**, v. 25, n. 2, p. 302-314, 2009.

LAMSAL, B. et al. Extrusion as a thermo-mechanical pre-treatment for lignocellulosic ethanol. **Biomass & Bioenergy**, v. 34, n. 12, p. 1703-1710, 2010.

LENINGHER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1995. 2a edição.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIM, H. V. In: LIMA, U.A. (Coord.). **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p.1-43. (Biotecnologia Industrial; v.3)

LIMAYEM, A.; RICKE, S. C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 449-467, 2012.

MALA B. RAO, et al. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. p. 597-635, 1998.

MADHAVAN, A. et al. Bioconversion of lignocellulose-derived sugars to ethanol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 22-48, 2012.

MENON, V.; RAO, M. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 522-550, 2012

MIRANDA Liceris. **Obtenção e caracterização de hidrolisados enzimáticos de proteínas do farelo de soja**. 2012. *Dissertação* (Mestrado em Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2011.

MIELLENZ, J. R. Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 324-329, 2001.

MIELLENZ, J. R.; BARDSLEY, J. S.; WYMAN, C. E. Fermentation of soybean hulls to ethanol while preserving protein value. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 14, p. 3532-3539, Jul 2009a.

MODENBACH, A. A.; NOKES, S. E. The use of high-solids loadings in biomass pretreatment-a review. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 109, n. 6, p. 1430-1442, 2012

MONSOOR, M. A.; PROCTOR, A. Preparation and functional properties of soy hull pectin. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 78, n. 7, p. 709-713, 2001

MOSIER, N. et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673-686, 2005.

NGUYEN, Q. et al. Two-stage dilute-acid pretreatment of softwoods. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84-86, n. 1, p. 561-576, 2000.

NISSEN-ADLER, J. **Enzymatic hydrolysis of food proteins**. Londres: Elsevier, 1986.

NOVOZYMES. **Ficha de informação do produto**: Novo-Pro D. 2011.

OLSSON, L.; HAHNHAGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 18, n. 5, p. 312-331, 1996

OTTO, Luiz.. **Estudo da viabilidade de uma proposta experimental para a dessolventização do farelo de soja**, 2009. 110p .*Dissertação* (Mestrado em Engenharia Química)-Departamento de Engenharia Química. Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2009.

PANAGIOTOPOULOS, I. A. et al. Effect of low severity dilute-acid pretreatment of barley straw and decreased enzyme loading hydrolysis on the production of fermentable substrates and the release of inhibitory compounds. **Journal of Cleaner Production**, v. 32, p. 45-51, 2012.

PAPATHEOFANOUS, M. G. et al. Two-stage acid-catalyzed fractionation of lignocellulosic biomass in aqueous ethanol systems at low temperatures. **Bioresource Technology**, v. 54, n. 3, p. 305-310, 1995

PENA-RAMOS, E. A.; XIONG, Y. L. Antioxidant activity of soy protein hydrolysates in a liposomal system. **Journal of Food Science**, v. 67, n. 8, p. 2952-2956, 2002

SARMADI, B. H.; ISMAIL, A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. **Peptides**, v. 31, n. 10, p. 1949-1956, 2010

SANTOS, P. **Uso de casca de soja ou bagaço decana-de-açúcar na alimentação de ovinos como fonte de fibra em rações contendo alta proporção de concentrado.** 2008. 62 p. Dissertação (Mestrado em agronomia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz. Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

SAUNDERS, R.M.; et al. Preparation of protein concentrates from shorts and wheat millrun by a wet alkaline process. **Cereal Chem.**, v.52, n.1, p.93-101, 1975

SIGMA ALDRICH. **Ficha de informação do produto.** Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/analytical-enzymes/chymotrypsin.html>. Acesso 30/07/ 2012.

SCHIRMER-MICHEL, A. C. et al. Production of ethanol from soybean hull hydrolysate by osmotolerant *Candida guilliermondii* NRRL Y-2075. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 8, p. 2898-2904, 2008

SEIBEL, N. F.; BELEIA, A. D. Carbohydrates from cotyledon fibers and proteins of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) derivatives. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 607-613, 2008.

SESSA, D. J. Processing of soybean hulls to enhance the distribution and extraction of value-added proteins. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, n. 1, p. 75-82, 2004.

SGARBIERI, V.C. Deterioração e modificações químicas, físicas e enzimáticas de proteínas. In: SGARBIERI, V.C. **Proteínas em alimentos protéicos: propriedades, degradações e modificações.** São Paulo : Varela, 1996. p.387-517.

SUMPHANWANICH, J. et al. Evaluation of dilute-acid pretreated bagasse, corn cob and rice straw for ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Annals of Microbiology**, v. 58, n. 2, p. 219-225, 2008

SUN, X. D. Enzymatic hydrolysis of soy proteins and the hydrolysates utilisation. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, n. 12, p. 2447-2459, 2011.

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

TAHERZADEH, M. J.; KARIMI, K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 9, p. 1621-1651, 2008.

TALEBNIA, F.; KARAKASHEV, D.; ANGELIDAKI, I. Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4744-4753, 2010.

TARDIOLI, Paulo. **Hidrólise controlada das proteínas do soro de queijo usando arboxipeptidase A e Alcalase imobilizadas multipontualmente em agarose.** 2003. 173 p. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Departamento de Eng. Química, UFSCar, São Carlos, 2003.

THEANDER, O.; WESTERLUND, E.; AMAN, P. Structure and components of dietary fiber. **Cereal Foods World**, v.38, n.3, p.135-141, 1993

TORGET, R. et al. Dilute-acid pretreatment of corn residues and short-rotation woody crops. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 28-29, n. 1, p. 75-86, 1991.

TURINO, Vicente. **Substituição da fibra em detergente neutro (FDN) do bagaço de cana-de-açúcar in natura pelo FDN da casca de soja em dietas contendo alta proporção de concentrado para cordeiros confinados.**2003. 60 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

VAN ZYL, W. H. et al. Next-generation cellulosic ethanol technologies and their contribution to a sustainable Africa. **Interface Focus**, v. 1, n. 2, p. 196-211, 2011.

VILLANUEVA, A. et al. Peptide characteristics of sunflower protein hydrolysates. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 76, n. 12, p. 1455-1460, 1999.

XU, C. et al. Biological pretreatment of corn stover by *irpex lacteus* for enzymatic hydrolysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 20, p. 10893-10898, 2010.

WALDRON, K.W.; PARKER, M.L.; SMITH, A.C. Plant cell walls and food quality. Comprehensive. **Reviews in Food Science and Food Safety**, Colney, v.2, n. 4, p.101-119, 2003.

WARD, O. P. Proteolytic enzymes. In: BLANCH, H. W.; DREW, S.; WANG, D. I. C. (Eds.). Comprehensive biotechnology. Oxford: Pergamon Press Ltd., 1985, v. 3, p. 789-817

WHITAKER, J. R. Principles of enzymology for the food sciences. 2ª edição. New York: Marcel Dekker Inc., 1994.

WOLF, Lucia. **Pré-tratamento organossolve do bagaço de cana de açúcar para a produção de etanol e xilooligossacarídeos.**2011. 138 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

YANG, B.; WYMAN, C. E. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. **Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr**, v. 2, n. 1, p. 26-40, Jan-Feb 2008

YOO, J. et al. Thermo-mechanical extrusion pretreatment for conversion of soybean hulls to fermentable sugars. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 16, p. 7583-7590, 2011

YU, J. et al. Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 2, p. 903-908, 2009.

ZHANG, X.; TU, M.; PAICE, M. G. Routes to potential bioproducts from lignocellulosic biomass lignin and hemicelluloses. **Bioenergy Research**, v. 4, n. 4, p. 246-257, 2011.

ZHU, J. Y.; ZHUANG, X. S. Conceptual net energy output for biofuel production from lignocellulosic biomass through biorefining. **Progress in Energy and Combustion Science**, v. 38, n. 4, p. 583-598, 2012.

ZHU, S. Use of ionic liquids for the efficient utilization of lignocellulosic materials. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 83, n. 6, p. 777-779, 2008.