



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

Murilo Amaral Fonseca

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS A
PARTIR DE CASCA DE SOJA**

São Carlos

2015



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

Murilo Amaral Fonseca

**AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE XILO-OLIGOSSACARÍDEOS A
PARTIR DE 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 concentração Pesquisa e Desenvolvimento de Processos Químicos.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Waldir Tardioli

São Carlos

2015

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F676a Fonseca, Murilo Amaral
Avaliação da produção de xilo-oligossacarídeos a partir de casca de soja / Murilo Amaral Fonseca. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
111 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

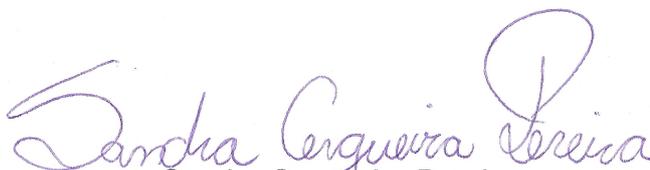
1. Casca de soja. 2. Xilo-oligossacarídeos. 3. Pré-tratamentos. 4. Reator micro-ondas. 5. Hidrólise enzimática. I. Título.

MEMBROS DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MURILO AMARAL FONSECA APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS, EM 30 DE MARÇO DE 2015.

BANCA EXAMINADORA:



Paulo Waldir Tardioli
Orientador, UFSCar



Sandra Cerqueira Pereira
EMBRAPA



Anny Manrich
EMBRAPA

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, meus pais José Alfredo e Eloisa, ao meu irmão Bruno e a minha avó Zélia que sempre estiveram ao meu lado me apoiando nesta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais José Alfredo e Eloisa, pelo amor incondicional, suporte emocional, ensinamentos e motivação para concretizar meus sonhos.

Ao meu irmão Bruno, por ser um grande amigo, pelo amor, cumplicidade e paciência.

Ao meu orientador Paulo Waldir Tardioli, pela oportunidade, orientação, paciência, e ensinamentos que contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional.

Aos amigos de laboratório, em especial: Bruna, Cintia, Gabriel, Gilson, Lionete, Luciano, Martha, Rafael, Renata, Vitor.

À Mayerlenis, pela paciência e grande ajuda desde o início do trabalho.

Aos técnicos, Aline, Amadeus, Thais e Thiago pela ajuda e importante suporte prestados.

Aos professores do Departamento de Eng. Química que contribuíram na minha formação.

Ao programa de pós-graduação e a CAPES, pelo apoio estrutural e financeiro.

À minha namorada Ligia, pelo amor, carinho, paciência e suporte em todos os momentos.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho.

RESUMO

Xilo-oligossacarídeos (XOS) são polímeros de xilose de cadeia curta (2 a 7 unidades) que podem ser obtidos por hidrólise enzimática da xilana presente na fração de hemicelulose dos materiais lignocelulósicos. XOS possuem um grande potencial como ingredientes prebióticos, e quando incorporados na dieta, podem fornecer muitos benefícios à saúde. O interesse mundial no aproveitamento de resíduos lignocelulósicos é cada vez maior, e no cenário nacional a casca de soja se destaca como um potencial resíduo da agroindústria brasileira. Para viabilizar a bioconversão desses resíduos em produtos de interesse comercial (etanol 2G e XOS, por exemplo) são necessários pré-tratamentos, que atuam desconstituindo/desorganizando a estrutura altamente recalcitrante do complexo lignocelulósico e separando as frações principais da biomassa: celulose, hemicelulose e lignina. Neste contexto, este trabalho teve por objetivo avaliar diferentes pré-tratamentos da biomassa para produzir sequencialmente XOS por ação de uma endoxilanase de *Bacillus subtilis*. Inicialmente as condições de máxima atividade catalítica dessa enzima foram avaliadas variando pH, tampão e temperatura. Dentre as variáveis estudadas, as que contribuíram para uma melhor atividade da endoxilanase foram tampão citrato de sódio (50mM) pH 5,5 e 45 °C. A casca de soja *in natura* (previamente caracterizada quimicamente) foi hidrolisada com endoxilanase solúvel com diferentes cargas enzimáticas (40, 80 e 100 U/g casca) nas condições de pH e temperatura pré-estabelecidas, produzindo em média 55 mg de AR/g biomassa seca. Esse resultado, embora pouco expressivo, demonstrou a viabilidade da produção de XOS a partir de casca de soja, requerendo, entretanto, um pré-tratamento adequado para melhorar a acessibilidade da endoxilanase à fração C-5 da biomassa. Os pré-tratamentos avaliados foram a desproteíntização enzimática da casca, pré-tratamento com peróxido de hidrogênio e ácido acético e pré-tratamento organossolve-etanol, variando nestes, as concentrações de solventes, tempo de reação e pré-tratamentos sequenciais. Adicionalmente, realizou-se a hidrólise enzimática da casca de soja *in natura* em reator micro-ondas. A desproteíntização da casca de soja mostrou-se ineficiente para a hidrólise da fração sólida remanescente com endoxilanase (produção de 30 mg de AR/g biomassa seca), embora esse pré-tratamento permita a recuperação de proteínas como um hidrolisado de alto valor nutricional. O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio (5 M, 1 h) para casca de soja desproteíntizada removeu 56% de lignina sem perdas de celulose, entretanto, este pré-tratamento não contribuiu para uma eficiente atuação da endoxilanase sobre a fração hemicelulósica (produção de aproximadamente 30 mg de AR/g biomassa seca). O pré-tratamento organossolve-etanol 50% (v/v) da casca de soja desproteíntizada removeu em torno de 50% de lignina com baixa solubilização de hemicelulose (< 17%), gerando, portanto, um líquido com baixa concentração de substrato para a ação da endoxilanase. Os pré-tratamentos organossolve-etanol 50 e 70% (v/v) da casca de soja *in natura* foram capazes de solubilizar em torno de 30% da hemicelulose, sendo possível a produção de 76 e 49 mg de AR/g de biomassa seca, respectivamente, após hidrólise com endoxilanase. Por fim, a ação das micro-ondas sobre a biomassa lignocelulósica provavelmente reduziu a recalcitrância da biomassa, pois a hidrólise da casca *in natura* com endoxilanase (100 U/g de casca) produziu aproximadamente 100 mg de AR/g de biomassa seca, ao contrário da hidrólise conduzida em reator com aquecimento convencional que produziu em torno de 52 mg de AR/g de biomassa seca. Os resultados deste trabalho indicam que a combinação de irradiação micro-ondas e hidrólise enzimática pode ser uma alternativa promissora para a produção de XOS.

Palavras chave: casca de soja; xilo-oligossacarídeos; pré-tratamentos; reator micro-ondas; hidrólise enzimática.

ABSTRACT

Xylooligosaccharides (XOS) are short-chain polymers of xylose (2 to 7 units) which can be produced by enzymatic hydrolysis of the xylan from the lignocellulosic feedstocks. XOS have a great potential as probiotic ingredients, and when they are incorporated in diets, they can provide many health benefits. The worldwide interest in the use of lignocellulosic residues is constantly growing, and in this scenario the soybean hull arises as a potential residue of the Brazilian agroindustry. The bioconversion of these residues to value-added products requires suitable pretreatments to deconstruct/disorganize the recalcitrant lignocellulosic complex, separating its main fractions: cellulose, hemicellulose, and lignin. In this context, this work did evaluate different biomass pretreatments aiming to produce XOS by the action of a *Bacillus subtilis* endoxylanase. Initially, the conditions for maximum catalytic activity of this enzyme were evaluated changing pH, buffer, and temperature. Among these parameters, 50 mM citrate buffer, pH 5.5, and 45 °C were the one that gave highest activity. The *in nature* soybean hull (previously chemically characterized) was hydrolyzed with soluble endoxylanase with different enzyme loads (40, 80, and 100 U/g biomass) under pre-established pH and temperature, producing around 55 mg RS/g dry biomass. This result, though little expressive, showed the viability of XOS production from soybean hull. However, this approach requires a suitable pretreatment of the lignocellulosic biomass to improve the endoxylanase accessibility to the C-5 fraction. Several pretreatments were performed in the soybean hulls, such as, enzymatic deproteinization, hydrogen peroxide/acetic acid pretreatment, and organosolv-ethanol pretreatment. For some pretreatments, reagent concentration and reaction time were evaluated, as well as, sequential pretreatment. Besides, enzymatic hydrolysis of the *in nature* soybean hull under microwave irradiation was also evaluated. The deproteinization of the soybean hull was not very efficient to the enzymatic hydrolysis of the remnant solid (production of 30 mg RS/dry biomass). However, this pretreatment allows the protein recovery as a high nutritional value hydrolysate. The pretreatment of the deproteinized soybean hulls with hydrogen peroxide solution (5 M, 1 h) removed 56% lignin without cellulose losses. However, this pretreatment did not contribute to an efficient action of the endoxylanase to the hemicellulose fraction (production of around 30 mg RS/g dry biomass). The organosolv-(50% v/v)ethanol pretreatment of the deproteinized soybean hulls promoted the removal of around 50% lignin, with low solubilization of hemicellulose (<17%), producing a poor substrate for the endoxylanase. The organosolv pretreatments with 50 and 70% (v/v) ethanol of the *in nature* soybean hull were able to solubilize around 30% hemicellulose, allowing the production of around 76 and 49 mg RS/g dry biomass, respectively, after hydrolysis with endoxylanase. Finally, the microwave action on the lignocellulosic biomass probably decreased the biomass recalcitrance, because the hydrolysis of the *in nature* soybean hulls catalyzed by the endoxylanase (100 IU / g of biomass) yielded approximately 100 mg of RS/g dry biomass. On the other hand, the hydrolysis performed in a reactor under conventional heating produced only 52 mg RS/g dry biomass. The results of this work did show that the combination of microwave irradiation and enzymatic hydrolysis might be a promising alternative to produce XOS.

Keywords: soybean hulls; xylo-oligosaccharides; pretreatments; microwave reactor; enzymatic hydrolysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Casca de soja <i>in natura</i>	30
Figura 2 – Estrutura geral do complexo lignocelulósico.....	31
Figura 3 – Representação da estrutura de celulose mostrando a ligação β -1,4 entre unidades de D-glicopirranose, as quais formam as cadeias lineares formando a celulose cristalina que por sua vez compõem a microfibrila.	32
Figura 4 – Representação da estrutura de hemicelulose mostrando a cadeia principal de xilose e diferentes variações de ligantes encontrados em plantas.....	34
Figura 5 – Representação da estrutura de lignina e seus precursores, álcool trans- <i>p</i> -cumarílico, álcool trans-coniferílico e álcool trans-sinapílico.....	35
Figura 6 – Desconstrução do complexo lignocelulósico após etapa de pré-tratamento.....	38
Figura 7 – Métodos de pré-tratamentos comumente utilizados e seus respectivos efeitos.	39
Figura 8 – Esquematização do mecanismo de aquecimento por irradiação micro-ondas.....	42
Figura 9 – Representação da ação das hemicelulases na degradação da hemicelulose.....	44
Figura 10 – Representação da estrutura tridimensional típica das endoxilanases das famílias 10 (produzida por <i>Streptomyces lividans</i>) e 11 (produzida por <i>Trichoderma reesei</i>).....	46
Figura 11 – Representação do mecanismo de ação das xilanases das famílias 10 (GH10) e 11 (GH11) em substrato de (A) glucuronoxilana, (B) arabinoxilana, e (C) xilana com ligações mistas de β -1,3 e β -1,4. As setas indicam os locais potenciais de hidrólise; os pentágonos com (X) representam as unidades de xilose ligadas por ligação glicosídica β -1,4 (e β -1,3 quando indicado); os triângulos com (M) representam as unidades ácido metilglucurônico; os pentágonos com (A) representam as unidades de arabinose.	47
Figura 12 – Fluxograma dos estudos realizados neste trabalho.	49
Figura 13 – Foto do reator convencional com tampa, aquecido por banho termostático e agitado mecanicamente, utilizado nas reações de hidrólise da casca de soja com endoxilanase solúvel.....	60
Figura 14 – Foto do reator convencional com tampa e impelidor utilizados nas reações de hidrólise da casca de soja com endoxilanase solúvel.	60
Figura 15 – Foto do reator micro-ondas Discover [®] da CEM Co. refrigerado a ar, com agitação mecânica e controlado por software computacional próprio para o aparelho.....	61
Figura 16 – Foto da vista superior do reator micro-ondas Discover [®] ; (A) com tampa fechada; (B) com tampa aberta; ambos com o balão reacional, extensor de vidro acoplado, impelidor de teflon com haste de alumínio e tampa de plástico (C).....	61

Figura 17 - Perfis de açúcares redutores (AR) em função do tempo a 45°C, pH 5,5, para casca de soja (CS) <i>in natura</i> (1:11, m/v), hidrolisada com endoxilanase recombinante de <i>B. subtilis</i>	70
Figura 18 – Perfis dos compostos solubilizados a 45°C, pH 5,5, para casca de soja (CS) <i>in natura</i> (1:11, m/v), em ensaio controle (s/ enzima)......	71
Figura 19 – Perfis de açúcares redutores em função do tempo a 45°C, pH 5,5 (tampão citrato de sódio 50 mM) para casca de soja (CS) <i>in natura</i> esterilizada e casca de soja <i>in natura</i> na presença de benzoato de sódio hidrolisadas com endoxilanase recombinante de <i>B. subtilis</i> . .	73
Figura 20 – Perfis de açúcares redutores em função do tempo a 45°C, pH 5,5 (tampão citrato de sódio 50 mM) de casca de soja pré-tratada com endoprotease Novo Pro-D® (frações sólida e líquida) hidrolisadas com endoxilanase recombinante de <i>B. subtilis</i> (7,3 U/mL).....	75
Figura 21 – Balanço de massa para os principais componentes da casca de soja para o processo sequencial de hidrólise proteolítica, pré-tratamento com peróxido de hidrogênio e hidrólise com endoxilanase.	79
Figura 22 – Perfis de açúcares redutores em função de tempo de hidrólise com endoxilanase da casca de soja pré-tratada sequencialmente com endoprotease Novo Pro-D® e peróxido de hidrogênio (5 e 10 M). Condições de hidrólise: 45°C, pH 5,5 (tampão citrato de sódio 50 mM) e 80 U/g de casca.	80
Figura 23 – Perfis de açúcares redutores em função do tempo na hidrólise com endoxilanase (45°C, pH 5,5) de casca de soja pré-tratada (proteólise seguido de organossolve 50% EtOH) frações sólidas e líquidas.....	83
Figura 24 - Balanço de massa para os principais componentes da casca de soja para o processo sequencial de hidrólise proteolítica, pré-tratamento organossolve-etanol 50% (v/v) e hidrólise com endoxilanase.	84
Figura 25 – Perfis de açúcares redutores em função do tempo na hidrólise com endoxilanase (45°C, pH 5,5) de casca de soja pré-tratada com o processo organossolve-etanol nas concentrações de 50 e 70% EtOH (v/v).	87
Figura 26 – Balanço de massa para os principais componentes da casca de soja <i>in natura</i> para o processo sequencial de pré-tratamento organossolve 50 e 70% (v/v) e hidrólise com endoxilanase.....	88
Figura 27 – Perfis de açúcares redutores em função do tempo para a hidrólise com endoxilanase (45°C, pH 5,5) da fração líquida de casca de soja após pré-tratamento organossolve/etanol 50 e 70% (v/v) em reator de micro-ondas.....	90
Figura 28 – Perfis de açúcares redutores em função do tempo para a hidrólise com endoxilanase (45°C, pH 5,5) de casca de soja <i>in natura</i> em reator de micro-ondas.	91
Figura 29 – Xilo-oligossacarídeos (XOS) identificados por CLAE solubilizados (Controle) pela CS <i>in natura</i> (reator convencional) - cromatogramas para os tempos de 0 e 3 horas de hidrólise.....	94

Figura 30 – Xilo-oligossacarídeos (XOS) identificados por CLAE produzidos por endoxilanase recombinante de <i>B. subtilis</i> (40 U/g de casca) para CS <i>in natura</i> (reator convencional) - cromatogramas para os tempos de 0 e 6 horas de hidrólise.....	94
Figura 31 – Xilo-oligossacarídeos (XOS) identificados por CLAE produzidos por endoxilanase recombinante de <i>B. subtilis</i> (40 U/g de biomassa inicial + 20 U/g de biomassa cada 12 h) para CS <i>in natura</i> (reator convencional) - cromatogramas para os tempos de 0 e 24 horas de hidrólise.....	95
Figura 32 – Xilo-oligossacarídeos (XOS) identificados por CLAE produzidos por endoxilanase recombinante de <i>B. subtilis</i> (80 U/g de casca) para CS <i>in natura</i> (reator convencional) - cromatogramas para os tempos de 0 e 6 horas de hidrólise.....	95
Figura 33 – Xilo-oligossacarídeos (XOS) identificados por CLAE produzidos por endoxilanase recombinante de <i>B. subtilis</i> (80 U/g de biomassa) para CS desproteínizada pré-tratada com H ₂ O ₂ 5M - cromatogramas para os tempos de 0 e 60 horas de hidrólise.	96
Figura 34 – Xilo-oligossacarídeos (XOS) identificados por CLAE produzidos por endoxilanase recombinante de <i>B. subtilis</i> (80 U/g de biomassa) para CS desproteínizada pré-tratada por organossolve-etanol 50% (v/v) - cromatogramas para os tempos de 0 e 12 horas de hidrólise.	96
Figura 35 – Xilo-oligossacarídeos (XOS) identificados por CLAE produzidos por endoxilanase recombinante de <i>B. subtilis</i> (7,3 U/mL) para a fração líquida da CS <i>in natura</i> pré-tratada por organossolve-etanol 50% (v/v) - cromatogramas para os tempos de 0 e 55 horas de hidrólise.....	97
Figura 36 – Xilo-oligossacarídeos (XOS) identificados por CLAE produzidos por endoxilanase recombinante de <i>B. subtilis</i> (80 U/g de biomassa) para CS <i>in natura</i> pré-tratada por organossolve-etanol 70% (v/v) - cromatogramas para os tempos de 0 e 24 horas de hidrólise.	97
Figura 37 – Xilo-oligossacarídeos (XOS) identificados por CLAE produzidos por endoxilanase recombinante de <i>B. subtilis</i> (7,3 U/mL) para a fração líquida da CS <i>in natura</i> pré-tratada por organossolve-etanol 70% (v/v) - cromatogramas para os tempos de 0 e 55 horas de hidrólise.....	98
Figura 38 – Xilo-oligossacarídeos (XOS) identificados por CLAE produzidos por endoxilanase recombinante de <i>B. subtilis</i> (80 U/g de casca) para CS <i>in natura</i> (reator de micro-ondas) - cromatograma para o tempo de 12 horas de hidrólise.	98
Figura 39 – Xilo-oligossacarídeos (XOS) identificados por CLAE produzidos por endoxilanase recombinante de <i>B. subtilis</i> (100 U/g de casca) para CS <i>in natura</i> (reator de micro-ondas) - cromatogramas para os tempos de 0 e 48 horas de hidrólise.....	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparativo de trabalhos existentes na literatura que utilizam irradiação micro-ondas (M-O).	42
Tabela 2 – Comparação entre as endoxilanasas das Famílias 10 e 11.	45
Tabela 3 – Produção de xilo-oligossacarídeos a partir de diferentes biomassas lignocelulósicas.	50
Tabela 4 – Concentrações de H ₂ O ₂ e ácido acético utilizadas nos pré-tratamentos da casca de soja desproteïnizada a 60°C, 250 rpm, razão sólido/líquido de 1:20 (m/v).....	58
Tabela 5 – Influência do pH e do tampão na atividade enzimática da endoxilanase	65
Tabela 6 – Influência do pH e do tampão na atividade enzimática da endoxilanase (descongelada).....	65
Tabela 7 – Influência da temperatura na atividade da endoxilanase	66
Tabela 8 – Composição química da casca de soja <i>in natura</i>	67
Tabela 9 – Granulometria da casca de soja <i>in natura</i>	69
Tabela 10 – Composições químicas percentuais (base massa seca) de casca de soja (CS) <i>in natura</i> e pré-tratada com endoprotease Novo Pro-D®.....	74
Tabela 11 - Composições químicas percentuais da fração sólida da casca de soja (CS) <i>in natura</i> e pré-tratada com peróxido de hidrogênio e ácido acético (CS/H ₂ O ₂ /HAc).....	76
Tabela 12 – Composições químicas percentuais de casca de soja (CS) <i>in natura</i> e pré-tratada com endoprotease seguido por H ₂ O ₂ /HAc.	77
Tabela 13 – Composições químicas percentuais de casca de soja (CS) <i>in natura</i> e pré-tratada com endoprotease, seguido por organossolve 50% EtOH e hidrólise enzimática.....	82
Tabela 14 – Composições químicas percentuais de casca de soja (CS) <i>in natura</i> e pré-tratada por organossolve-etanol nas concentrações de 50 e 70% EtOH, frações sólida e líquida.	85
Tabela 15 – Comparação entre os rendimentos de extração de hemicelulose no sólido e o rendimento quantificado na fração líquida; e a distribuição da fração líquida em oligômeros e monômeros de hemicelulose.	86
Tabela 16 – Massa de xilo-oligômeros e rendimentos de extração de xilo-oligômeros e xilose em relação à xilana solubilizados para as respectivas condições de pré-tratamento organossolve.	86

LISTA DE ABREVIATURAS

A_{pd} : absorvância de HMF e MF em 280 nm, calculada pela Equação 3

AR: Açúcares redutores

A_t : absorvância do hidrolisado ácido em 280 nm

C_1 : concentração de MF no hidrolisado em (g/L), determinado por CLAE

C_2 : concentração de HMF no hidrolisado em (g/L), determinado por CLAE

C-5: xilose e arabinose

C-6: glicose, galactose e manose

C_{HCl} : Concentração de ácido clorídrico usado na titulação (M)

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

C_N : Concentração de nitrogênio total (g/L)

CS: Casca de soja

Da: Dalton

DNS: Ácido 3,5-dinitrossalicílico

E2G: Etanol de segunda geração

EtOH: Etanol

FL: Fração líquida

FS: Fração sólida

HAc: Ácido acético

HMF: 5-hidroximetil-2-furfuraldeído

M_{biomassa} : massa de biomassa (casca de soja), base seca, submetida à hidrólise ácida (g)

m_{cf} : massa de casca de soja final no cartucho (g)

m_{ci} : massa de casca de soja inicial no cartucho (g)

M_{cinzas} : massa de cinzas (g)

MF: 2-furfuraldeído

M_{filtrado} : massa de sólidos retidos no filtro, base seca (g)

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

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

M-O: micro-ondas

M_x : massa de xilose livre quantificada na fração líquida (g)

M_{xH} : massa de xilose total quantificada após hidrólise ácida (g)

$M_{\text{xilo-oligômeros}}$: massa de xilo-oligômeros (g)

M_{xT} : massa de xilose teórica presente na biomassa submetida a hidrólise enzimática (g)

R_x : rendimento de extração de xilose (%)

$R_{\text{xilo-oligômeros}}$: rendimento de extração de xilo-oligômeros (%)

U: Unidade de atividade enzimática (1 μmol de produto/minuto)

UV: Ultravioleta

V_{amostra} : Volume da amostra em mL

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

X2, X3, X4, X5, X6: xilobiose, xilotriose, xilotetraose, xilopentose, xilohexose

XOS: Xilo-oligossacarídeos

ε_1 : absorptividade do MF (146,85 L/g)

ε_2 : absorptividade do HMF (144 L/g)

η : Rendimento mássico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
1.1. Objetivo geral	26
1.1.1. Objetivos específicos	26
2. REVISÃO DA LITERATURA	29
2.1. Soja: características e origem	29
2.2. A casca de soja	29
2.3. Complexo lignocelulósico.....	31
2.3.1. Celulose	32
2.3.2. Hemicelulose	33
2.3.3. Lignina	34
2.3.4. Extrativos e cinzas	36
2.3.5. Proteínas.....	36
2.3.6. Pectina.....	37
2.4. Pré-tratamento	37
2.4.1. Pré-tratamento com peróxido de hidrogênio/ácido acético	40
2.4.2. Pré-tratamento organossolve.....	41
2.4.3. Reator micro-ondas.....	41
2.5. Enzimas	43
2.5.1. Hemicelulases	43
2.5.2. Xilanases	45
2.6. Xilo-oligossacarídeos	47
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
3.1. Material	51
3.2. Métodos.....	51
3.2.1. Caracterização química da casca de soja	51

3.2.1.1. Determinação do teor de extrativo	51
3.2.1.2. Hidrólise ácida.....	52
3.2.1.3. Determinação de lignina solúvel	53
3.2.1.4. Análise dos carboidratos e ácidos orgânicos.....	53
3.2.1.5. Análise de MF e HMF.....	54
3.2.1.6. Determinação da lignina insolúvel	54
3.2.1.7. Determinação de cinzas.....	55
3.2.1.8. Determinação do teor de proteínas.....	55
3.2.1.9. Determinação de umidade	56
3.2.1.10. Análise granulométrica	56
3.2.1.11. Cálculo do rendimento mássico	57
3.2.2. Hidrólise proteolítica	57
3.2.3. Pré-tratamento com peróxido de hidrogênio/ácido acético	58
3.2.4. Pré-tratamento com organossolve-etanol	58
3.2.5. Hidrólise enzimática de biomassas com endoxilanase	59
3.2.6. Medida de atividade enzimática	61
3.2.7. Influência da temperatura e do pH na atividade da endoxilanase	62
3.2.8. Análise dos carboidratos e ácidos orgânicos das frações líquidas.....	62
3.2.9. Quantificação dos xilo-oligômeros e cálculo do rendimento de extração.....	62
3.2.10. Análise de XOS por cromatografia líquida de troca iônica.....	63
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
4.1. Caracterização da endoxilanase comercial	65
4.2. Caracterização da casca de soja <i>in natura</i>	67
4.3. Hidrólise enzimática de casca de soja <i>in natura</i>	69
4.4. Pré-tratamento proteolítico da casca de soja e hidrólise com endoxilanase.....	74
4.5. Pré-tratamento com peróxido de hidrogênio/ácido acético (H ₂ O ₂ /HAc)	76
4.6. Pré-tratamento organossolve-etanol	81

4.7. Hidrólise de casca de soja <i>in natura</i> com endoxilanase em reator de micro-ondas.....	89
4.8. Identificação de XOS	92
5. CONCLUSÕES.....	101
6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	103
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105

1. INTRODUÇÃO

Grandes quantidades de resíduos lignocelulósicos são geradas constantemente na agroindústria. Sem alto valor comercial, a indústria destina a maior parte destes resíduos para a queima ou para alimentação animal. No entanto, esses resíduos são potencialmente importantes para a geração de produtos de valor agregado, dentre eles está o etanol de segunda geração (E2G). Para que a produção de E2G seja economicamente viável, faz-se necessário a aplicação do conceito de biorefinaria, em que todas as frações da biomassa lignocelulósica são utilizadas para a geração de produtos de interesse comercial. Como exemplo, a hemicelulose, rica em xilana, pode ser utilizada na produção de xilose, xilitol, E2G e xilo-oligossacarídeos (BRAGATTO; SEGATO; SQUINA, 2013; MANDELLI et al., 2014).

Dentre os resíduos lignocelulósicos mais abundantes da agroindústria brasileira está a casca de soja. O Brasil é atualmente o segundo maior produtor mundial do grão de soja, com estimativa de produção para a safra de 2014/2015 de 93,2 milhões de toneladas (CONAB, 2015). Considerando que a casca de soja corresponde de 8 a 10% do grão (GNANASAMBANDAM; PROCTOR, 1999), estima-se uma geração em torno de 7,4 milhões de toneladas de casca.

A casca de soja possui uma composição química que varia de 29-51% de celulose, 10-20% de hemicelulose, 2-9% de lignina, 4-8% de pectinas, 9-15% de proteínas, e compostos orgânicos e inorgânicos em menor quantidade, como extrativos e cinzas. Devido ao alto conteúdo de proteínas, a casca de soja é atualmente destinada à alimentação animal (MIELENZ; BARDSLEY; WYMAN, 2009; ROJAS et al., 2014).

A xilana é a principal cadeia linear (espinha dorsal) que compõe a hemicelulose, um dos polissacarídeos mais comuns na natureza (SAHA, 2003). Este polissacarídeo forma ligações covalentes com moléculas de lignina e ligações de hidrogênio com moléculas de celulose, desempenhando uma importante função estrutural nas células vegetais. A hemicelulose é constituída por aproximadamente 90% de D-xilose e 10% de L-arabinose, possuindo ramificações (LIMAYEM; RICKE, 2012) e baixo grau de polimerização (~200) (KESHWANI, 2010).

Xilo-oligossacarídeos (XOS) são polímeros de cadeia curta (2 a 7 unidades de xilose e suas variações, tais como arabino-xilo-oligossacarídeos) (NABARLATZ; EBRINGEROVÁ; MONTANÉ, 2007), obtidos por hidrólise das cadeias de xilana da fração

hemicelulósica. Os XOS com 2 a 4 unidades de xilose são importantes insumos para a indústria de alimentos e de fármacos, sendo classificados como ingredientes prebióticos benéficos à saúde humana, auxiliando o aumento da população de bactérias probióticas (bifidobactérias e bactérias lácteas) que metabolizam os XOS produzindo ácidos graxos de cadeia curta, responsáveis por melhorar a saúde do ser humano como um todo (BRAGATTO; SEGATO; SQUINA, 2013; VÁZQUEZ et al., 2000). Além disso, tem sido reportado que os XOS contribuem para a redução do colesterol e de lesões pré-cancerosas e melhoram a disponibilidade biológica de cálcio (MADHUKUMAR; MURALIKRISHNA, 2010).

Para a produção de XOS, a xilana pode ser hidrolisada enzimaticamente com endoxilanases. Diferente das β -xilosidases que atuam quebrando a xilana em seus monômeros (xilose), as endoxilanases atuam hidrolisando randomicamente as ligações glicosídicas β -1,4 da xilana, produzindo os oligossacarídeos de alto valor agregado (BRAGATTO; SEGATO; SQUINA, 2013). Entretanto, devido à presença de lignina na biomassa lignocelulósica, a hidrólise enzimática pode ser dificultada. Assim, fazem-se necessários pré-tratamentos (físicos, químicos, biológicos ou a combinação destes) para remover/redistribuir a lignina e aumentar a susceptibilidade da hemicelulose ao ataque enzimático (BRAGATTO; SEGATO; SQUINA, 2013).

Neste contexto, este trabalho tem como objetivo avaliar a ação de uma endoxilanase recombinante de *Bacillus subtilis* sobre a casca de soja *in natura* e pré-tratada, visando à produção de xilo-oligossacarídeos.

1.1. Objetivo geral

Estudar melhores condições para produção de xilo-oligossacarídeos por rota enzimática em reator de aquecimento convencional e micro-ondas, utilizando uma endoxilanase recombinante de *Bacillus subtilis* a partir da casca de soja *in natura* ou pré-tratada por peróxido de hidrogênio/ácido acético, desproteíntização enzimática e organossolve-etanol.

1.1.1. Objetivos específicos

- Analisar a influência do pH, tampão e temperatura para obter melhor atividade da endoxilanase recombinante de *Bacillus subtilis*;

- Caracterizar a casca de soja *in natura* quanto a sua composição química;
- Avaliar o perfil das hidrólises enzimáticas ao longo do tempo, variando-se a carga enzimática;
- Analisar a influência de pré-tratamentos da casca de soja *in natura* para melhor disposição da fração de hemicelulose;
- Avaliar o efeito dos pré-tratamentos na hidrólise enzimática com a endoxilânase recombinante de *Bacillus subtilis*;
- Comparar a hidrólise enzimática em reator por aquecimento convencional com o aquecimento por micro-ondas;
- Analisar os produtos de hidrólise na fração líquida para concentração de açúcares redutores e XOS formados.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Soja: características e origem

A soja (*Glycine max*), atualmente cultivada em todo o mundo, é fruto do melhoramento de plantas rasteiras que habitavam a China antiga, principalmente ao longo do Rio Amarelo. Uma das primeiras plantas cultivadas teve iniciada sua exploração no continente americano apenas no começo do século XX pelos Estados Unidos, e hoje possui como principais produtores, Brasil, Estados Unidos, Argentina, China e Índia, totalizando uma produção mundial em torno de 318 milhões de toneladas em 2015 (EMBRAPA, 2000; USDA, 2015).

Os primeiros estudos sobre a soja em solo brasileiro foram realizados em 1882. Introduzida via Estados Unidos, a soja dessa época, assim como naquele país, era estudada como cultura forrageira. A partir da década de 1960, com incentivos financeiros oferecidos pelo governo brasileiro e o crescimento significativo da produção na década seguinte, a soja começou a se consolidar como principal cultura do agronegócio brasileiro, apresentando nas décadas seguintes grandes crescimentos da produção e crescimento expressivo da área cultivada. A soja gerou uma revolução socioeconômica e tecnológica comparada ao ocorrido com a cana-de-açúcar no Brasil Colônia e o café no Brasil Império/República, impulsionando a interiorização da população brasileira e a aceleração da urbanização do país (EMBRAPA, 2000).

Atualmente, o Brasil é o segundo maior produtor mundial do grão de soja, com estimativa de produção para a safra de 2014/2015 de 96,05 milhões de toneladas (CONAB, 2015).

Da família das leguminosas, assim como o feijão, ervilha e outros, a soja possui um papel muito importante na dieta alimentar, com um grão rico em proteínas, minerais e algumas importantes vitaminas, como a riboflavina e niacina, que desempenham importante papel no metabolismo humano (EMBRAPA, 2000).

2.2. A casca de soja

A casca de soja (CS), Figura 1, é o principal subproduto da indústria processadora de soja, principalmente da produção de óleo de soja, farelo de soja, lecitina e

outros produtos de alto teor proteico (MANDARINO; ROESSING, 2001). Correspondendo de 8 a 10% do peso do grão de soja inteiro, pode-se estimar que a produção de casca de soja alcance cerca de 7,4 milhões de toneladas na safra de 2014/2015 (GNANASAMBANDAM; PROCTOR, 1999).

Figura 1 – Casca de soja *in natura*.



Fonte: Acervo pessoal

A CS é removida mecanicamente nas primeiras etapas do processamento, quando os grãos são quebrados e as cascas removidas por aspiração. Esta etapa de aspiração é realizada para aumentar a porcentagem de proteínas no farelo de soja, obtendo-se um aumento de 6 a 8% de proteína bruta no farelo final sem casca, o qual contém de 48 a 50% de proteína bruta (SANTOS, 2008; FERREIRA, 2008; TURINO, 2003).

Sem utilização na indústria, a casa de soja é atualmente comercializada como ração animal. Considerada um suplemento energético com desempenho comparável ao do milho, devido à alta digestibilidade da parede celular e altas concentrações de celulose e proteínas, a CS é utilizada na dieta de ruminantes, rações com baixo teor de gordura para animais domésticos e aditivos de massa em alimentos (ALEMDAR; SAIN, 2008; SANTOS, 2008).

A composição química da casca de soja pode variar em função da eficiência do processo de extração, que é realizada com maior ou menor intensidade visando maiores ou menores concentrações de proteína no farelo. Conseqüentemente, as composições podem variar de 29-51% de celulose, 10-20% de hemicelulose, 2-9% de lignina, 4-8% de pectinas, 9-15% de proteínas, e compostos orgânicos e inorgânicos em menor quantidade, como extrativos e cinzas (MIELENZ; BARDSLEY; WYMAN, 2009; ROJAS et al., 2014).

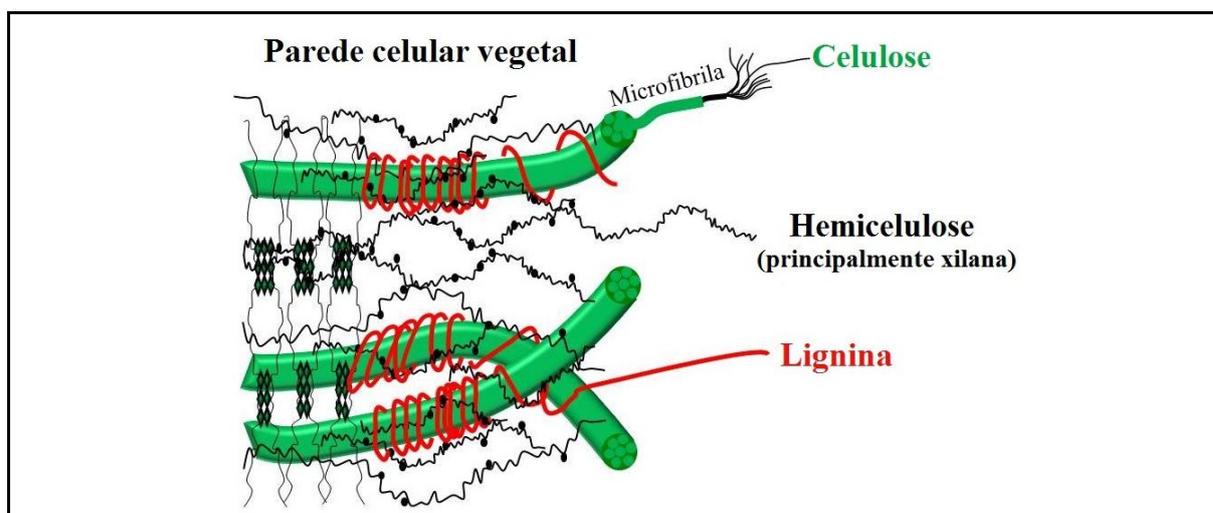
Com uma mistura única de carboidratos, concentrações significativas de proteínas e baixas concentrações de lignina, comparado com outras biomassas, a casca de soja é uma fonte atrativa de açúcares fermentescíveis, xilo-oligossacarídeos e hidrolisados proteicos (MIELENZ; BARDSLEY; WYMAN, 2009; MIELENZ, 2001).

2.3. Complexo lignocelulósico

Com um rápido aumento na demanda mundial de etanol e as limitações de se aumentar a produção atual, baseada no amido de milho e na cana-de-açúcar, sem competir com a agricultura de alimentos e depender das limitações climáticas, surgem com grande potencial de aumento da produção de etanol, os materiais lignocelulósicos (gramíneas, madeiras e resíduos agrícolas), com abundância em quase todo mundo e baixo valor comercial (KESHWANI, 2010).

A estrutura geral do complexo lignocelulósico (Figura 2) é formada por longas cadeias de celulose interligadas por ligações de hidrogênio com moléculas de hemicelulose entrelaçadas, formando uma estrutura altamente complexa que é protegida por lignina, presente na parede celular vegetal. Esta estrutura também possui pequenas concentrações de pectinas, compostos inorgânicos, proteínas e extrativos, variando suas concentrações de acordo com as espécies, tecidos e tempo de crescimento (BRANDT et al., 2013a).

Figura 2 – Estrutura geral do complexo lignocelulósico.



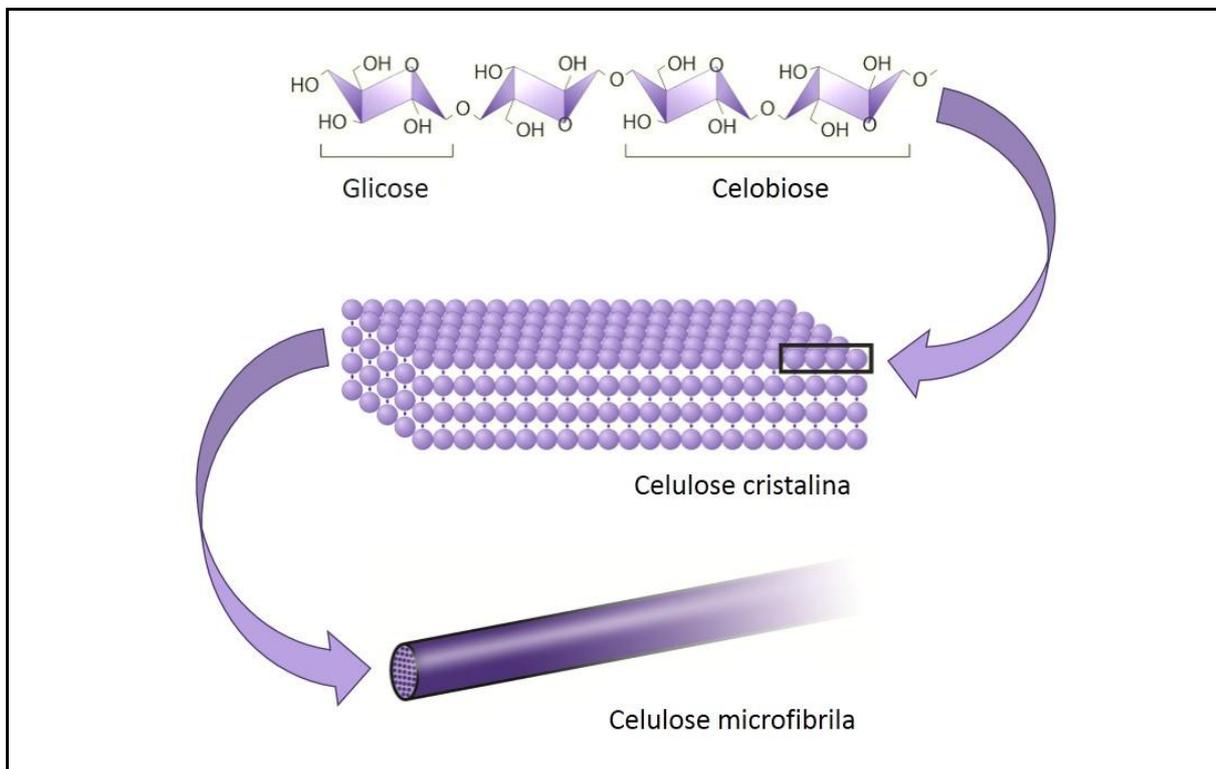
Fonte: Adaptado de RATANAKHANOKCHAI et al. (2013).

Para a conversão dos materiais lignocelulósicos em etanol são necessárias três etapas principais, sendo essas: pré-tratamento, hidrólise e fermentação. Na etapa de pré-tratamento é desconstituída/desorganizada a estrutura complexa lignocelulósica, tornando acessíveis na etapa de hidrólise as moléculas de celulose e hemicelulose, que serão hidrolisadas em suas frações monoméricas de glicose e xilose, respectivamente. Finalmente, na etapa de fermentação, os açúcares fermentescíveis liberados na etapa de hidrólise serão convertidos em etanol (SAXENA; ADHIKARI; GOYAL, 2009).

2.3.1. Celulose

A celulose é o carboidrato mais abundante na natureza e o principal componente da parede vegetal; é um homopolissacarídeo linear formado por unidades de β -D-glicopiranosose ($C_6H_{10}O_5$)_n que se unem entre si via ligação glicosídica β -1,4 formando a unidade repetitiva de celobiose, conforme ilustrado na Figura 3 (MÄKI-ARVELA et al., 2011; O’SULLIVAN, 1997).

Figura 3 – Representação da estrutura de celulose mostrando a ligação β -1,4 entre unidades de D-glicopiranosose, as quais formam as cadeias lineares formando a celulose cristalina que por sua vez compõem a microfibrila.



Fonte: Adaptado de US DOE (2007)

O ângulo formado pela ligação glicosídica β -1,4 resulta em uma estrutura linear com 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 resistente, as microfibrilas, que constituem a fibrila de celulose (KESHWANI, 2010).

O agregado de cadeias de celulose formado nas microfibrilas possui regiões cristalinas, que são fortemente organizadas com uma grande resistência, e regiões amorfas, que possuem uma menor orientação entre as moléculas e maior flexibilidade. As propriedades de grau de cristalinidade, grau de polimerização e a largura das microfibrilas variam de acordo com a fonte do material, a idade e o pré-tratamento que a fibra foi exposta (KESHWANI, 2010; O'SULLIVAN, 1997).

2.3.2. Hemicelulose

A hemicelulose é um dos polissacarídeos mais comuns na natureza, representando de 20 a 35% do complexo lignocelulósico, variando conforme a biomassa. É constituída principalmente por polímeros de pentoses (xilose e arabinose), além de hexoses (manose, glicose, galactose, ramnose e fucose) e ácidos urônicos (galacturônico, glucurônico e metil-glucurônico) (SAHA, 2003).

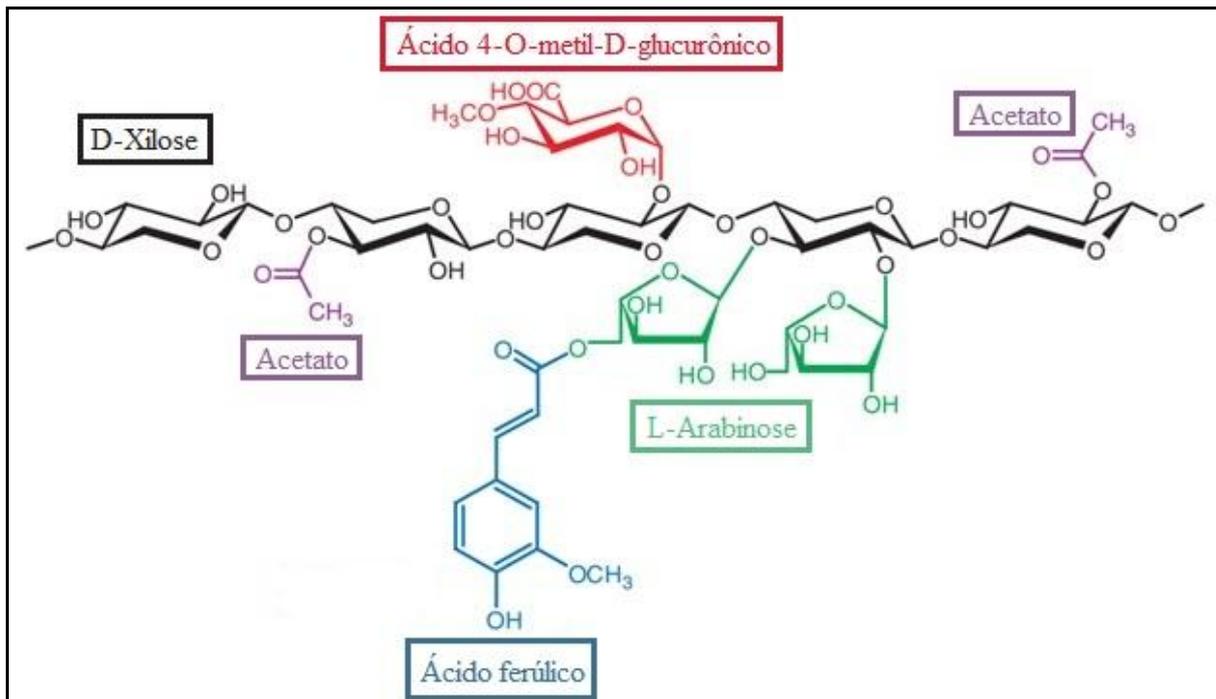
A hemicelulose é um heteropolissacarídeo capaz de realizar ligações covalentes com moléculas de lignina e ligações de hidrogênio com moléculas de celulose, formando um arranjo pouco fibroso que apresenta somente regiões amorfas, com baixo grau de polimerização (~200) que promovem estabilidade e flexibilidade ao complexo lignocelulósico (KESHWANI, 2010).

Pode-se classificar a hemicelulose em classes e subclasses de acordo com os açúcares presentes na cadeia linear principal (espinha dorsal), tais como xilanas, mananas e glucanas, e suas subclasses, glucuronoxilanas, arabinoxilanas, glucomananas, galactoglucomananas, xiloglucanas, arabinoglucuronoxilanas, entre outras, que variam de acordo com a espécie da planta, tipo de tecido e estágio de desenvolvimento (OGEDA; PETRI, 2010).

As hemiceluloses mais comuns são as xilanas, formadas por unidades de D-xilose unidas por ligações glicosídicas β -1,4 na cadeia linear principal (Figura 4) e diferentes carboidratos e ácidos urônicos em cadeias laterais (ramificações). Devido à grande quantidade

de xilose, as xilanas se destacam como matéria-prima para a formação de diversos produtos de valor agregado como, xilose, xilitol, E2G e xilo-oligossacarídeos (LIMAYEM; RICKE, 2012).

Figura 4 – Representação da estrutura de hemicelulose mostrando a cadeia principal de xilose e diferentes variações de ligantes encontrados em plantas.

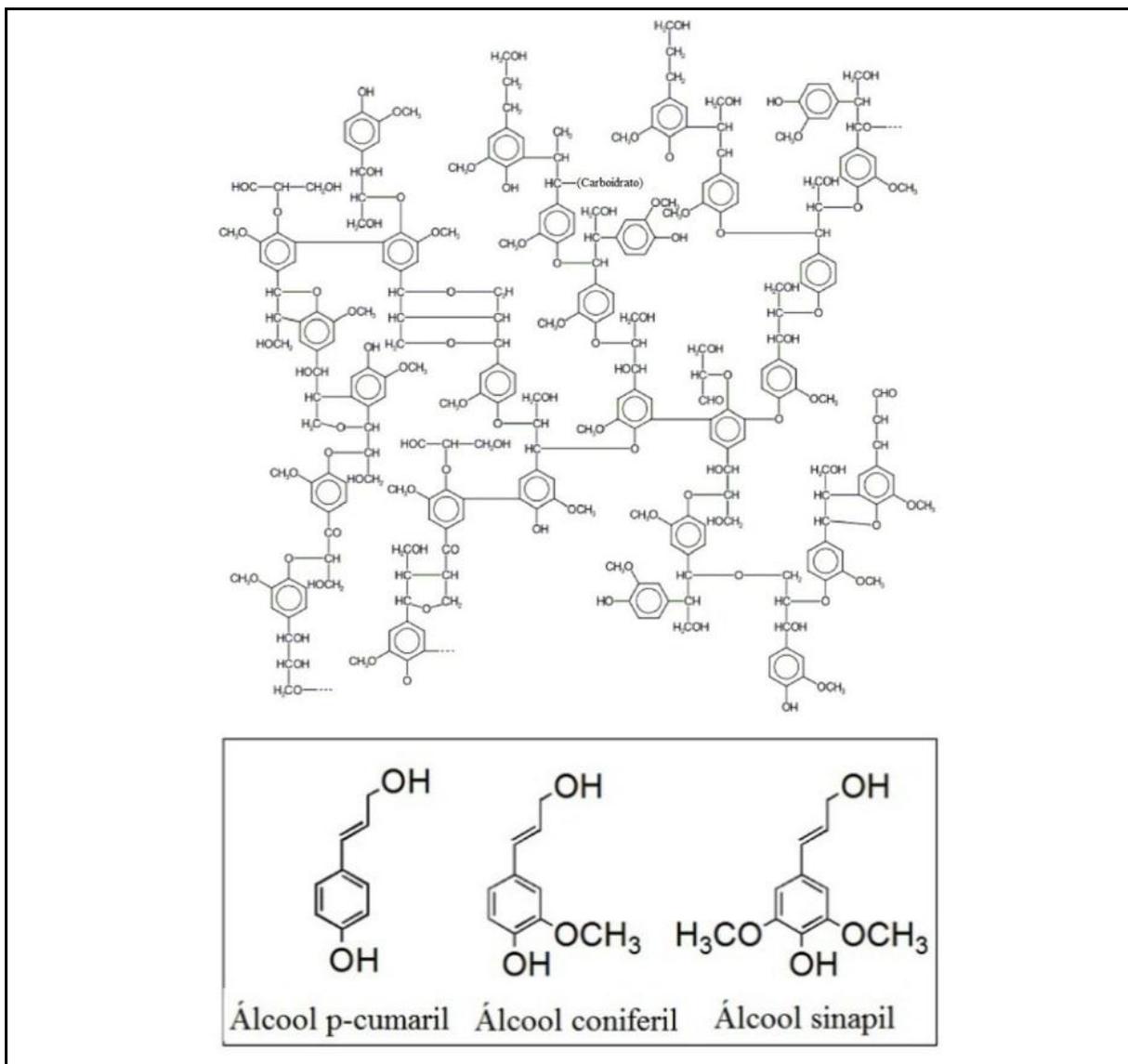


Fonte: Adaptado de DODD; CANN (2009)

2.3.3. Lignina

A lignina é um heteropolímero aromático complexo formado por ligações éter de unidades de fenilpropano, que são derivadas da polimerização oxidativa de três álcoois precursores (Figura 5): álcool trans-*p*-cumarílico, álcool trans-coniferílico e álcool trans-sinapílico, obtidos a partir da conversão da glicose em aminoácidos aromáticos por meio da via metabólica do ácido chiquímico (BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003; FARRELL, 1987; KESHWANI, 2010).

Figura 5 – Representação da estrutura de lignina e seus precursores, álcool trans-*p*-cumarílico, álcool trans-coniferílico e álcool trans-sinapílico.



Fonte: Adaptado de CHRISTOPHER; YAO; JI (2014)

Essa macromolécula de lignina é responsável por várias funções vitais nas plantas como a resistência estrutural, atuando como um cimento e gerando uma grande força de adesão entre as fibras da planta. A lignina por ter uma natureza hidrofóbica também atua diminuindo a permeabilidade da água nas paredes das células do xilema, tecido responsável pelo transporte vascular de água e nutrientes. Diretamente responsável pela recalcitrância do material vegetal, a lignina atua na proteção biológica, defendendo a parede celular da planta contra degradação química e enzimática (BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003; SARKANEN; LUDWIG, 1971; CHENG, 2010).

A lignina, que representa de 10 a 30% da massa total dos materiais lignocelulósicos é depositada como último componente na parede celular, após celulose e hemicelulose. Sua deposição gradual forma ligações covalentes com a hemicelulose, que por sua vez, está ligada a celulose por ligações de hidrogênio, criando um resistente complexo carboidrato-lignina (ADLER, 1977; BOERJAN; RALPH; BAUCHER, 2003).

2.3.4. Extrativos e cinzas

O termo extrativo é utilizado para descrever uma grande variedade de compostos orgânicos presentes na biomassa, que podem representar de 5 a 20% do material vegetal. Esses compostos podem ser extraídos utilizando solventes polares (como água e álcool) e apolares (como tolueno e hexano). Os extrativos são compostos neutros com baixo teor de oxigênio, que possuem uma tendência de se separar da matriz polar (KESHWANI, 2010; MOHAN; PITTMAN,.; STEELE, 2006; OASMAA et al., 2003).

As concentrações e composições dos extrativos variam de acordo com o tipo de planta, localização geográfica e estação climática. Os extrativos estão geralmente associados à metabólitos secundários responsáveis pela fragrância, cor, sabor e resistência natural ao apodrecimento e ataque microbiano e de insetos (KESHWANI, 2010; MOHAN; PITTMAN,.; STEELE, 2006).

As substâncias extrativas mais comuns encontradas em vegetais são: ácidos graxos, ceras, terpenos/terpenóides, proteínas, óleos essenciais, compostos aromáticos (aldeídos, ácidos, álcoois, flavonoides, quinonas e taninos), pectinas, mucilagens, gomas, resinas amidos, saponinas e açúcares simples (MOHAN; PITTMAN,.; STEELE, 2006; OASMAA et al., 2003).

As cinzas são constituídas basicamente por cálcio, potássio, manganês, sulfatos, carbonatos e silicatos. São compostos inorgânicos necessários no metabolismo das plantas e que representam uma baixa concentração do material vegetal (CURVELO, 1992).

2.3.5. Proteínas

As proteínas estão presentes nas células vegetais realizando a arquitetura entre os componentes por meio de ligações cruzadas; elas podem ser divididas em três classes estruturais. Na classe das extensivas, estão as glicoproteínas básicas ricas em hidroxiprolina, serina, tirosina e lisina. Em outra classe estão as proteínas ricas em glicinas, caracterizadas pela repetitividade Glicina-X, sendo X frequentemente glicina. Finalizando, encontram-se as

proteínas ricas em prolina e hidroxiprolina que contêm unidades repetidas de Prolina-Prolina-Valina-X-Lisina, em que X é frequentemente histidina, tirosina ou glicina (SEIBEL e BELEIA, 2008).

As proteínas presentes na casca de soja, assim como as do farelo de soja, são fontes ricas em ácido glutâmico (14,84%), ácido aspártico (11,19%), glicina (7,93%), leucina (7,58%) e lisina (7,09%), do total de aminoácidos presentes. A casca também apresenta baixas concentrações de metionina (0,86%), cisteína (2,11%) e histidina (2,79%), do total de aminoácidos presentes (CUNNINGHAM; CECAVA; JOHNSON, 1993).

2.3.6. Pectina

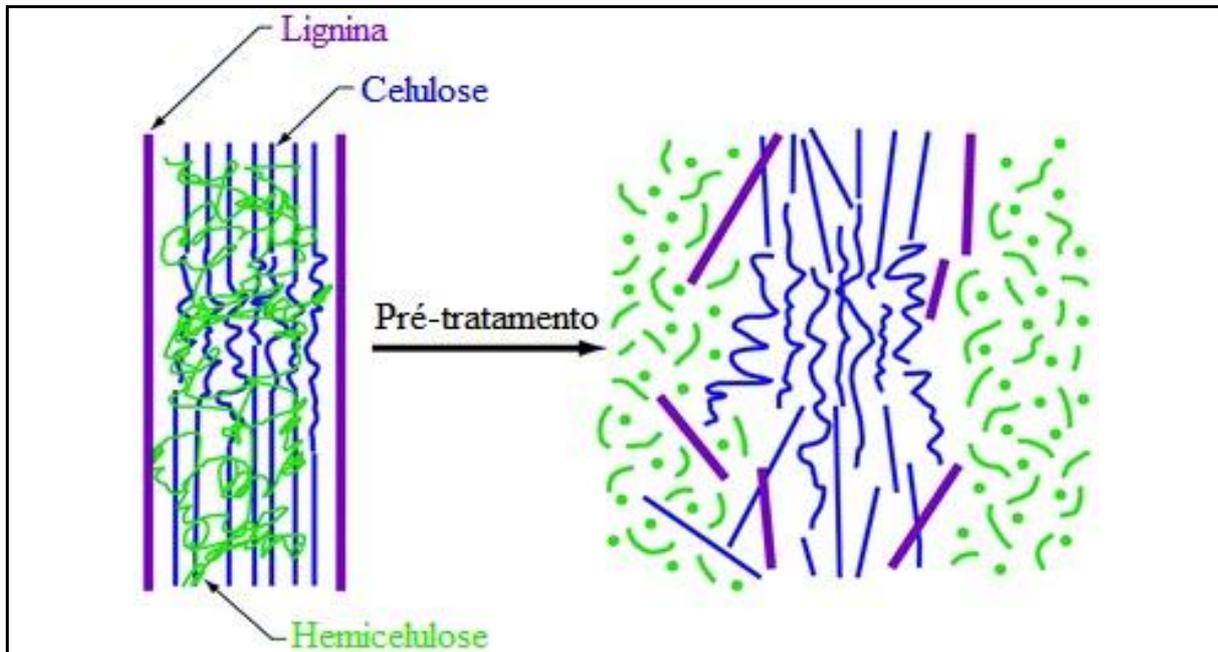
A pectina é um polissacarídeo ramificado constituído basicamente por ácido D-galacturônico, arabinose, ramnose e galactose, estando presente na lamela média das células vegetais. Este carboidrato complexo pode ser dividido em três grandes grupos: homogalacturonanos, ramnogalacturonanos e xilogalacturonanos (MONSOOR; PROCTOR, 2001; SEIBEL; BELÉIA, 2008).

A pectina forma uma rede tridimensional (gel hidratado), que promove a adesão intercelular, proporcionando rigidez à estrutura primária dos vegetais. Este gel é formado através de ligações de hidrogênio entre grupos carboxila livres, nas moléculas de pectina, e hidroxilas nas moléculas adjacentes, e através de ramificações da pectina, formando uma rede de ligações cruzadas (GUILLOTIN, 2005).

2.4. Pré-tratamento

A hidrólise enzimática dos carboidratos presentes na biomassa em açúcares fermentescíveis é limitada devido a diversos fatores relacionados a estrutura complexa e recalcitrante do material lignocelulósico *in natura*. Os fatores limitantes à hidrólise ocorrem devido ao grau de polimerização das moléculas, teor de umidade, área superficial disponível (ou porosidade), concentração de lignina e cristalinidade da celulose (AGBOR et al., 2011; HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

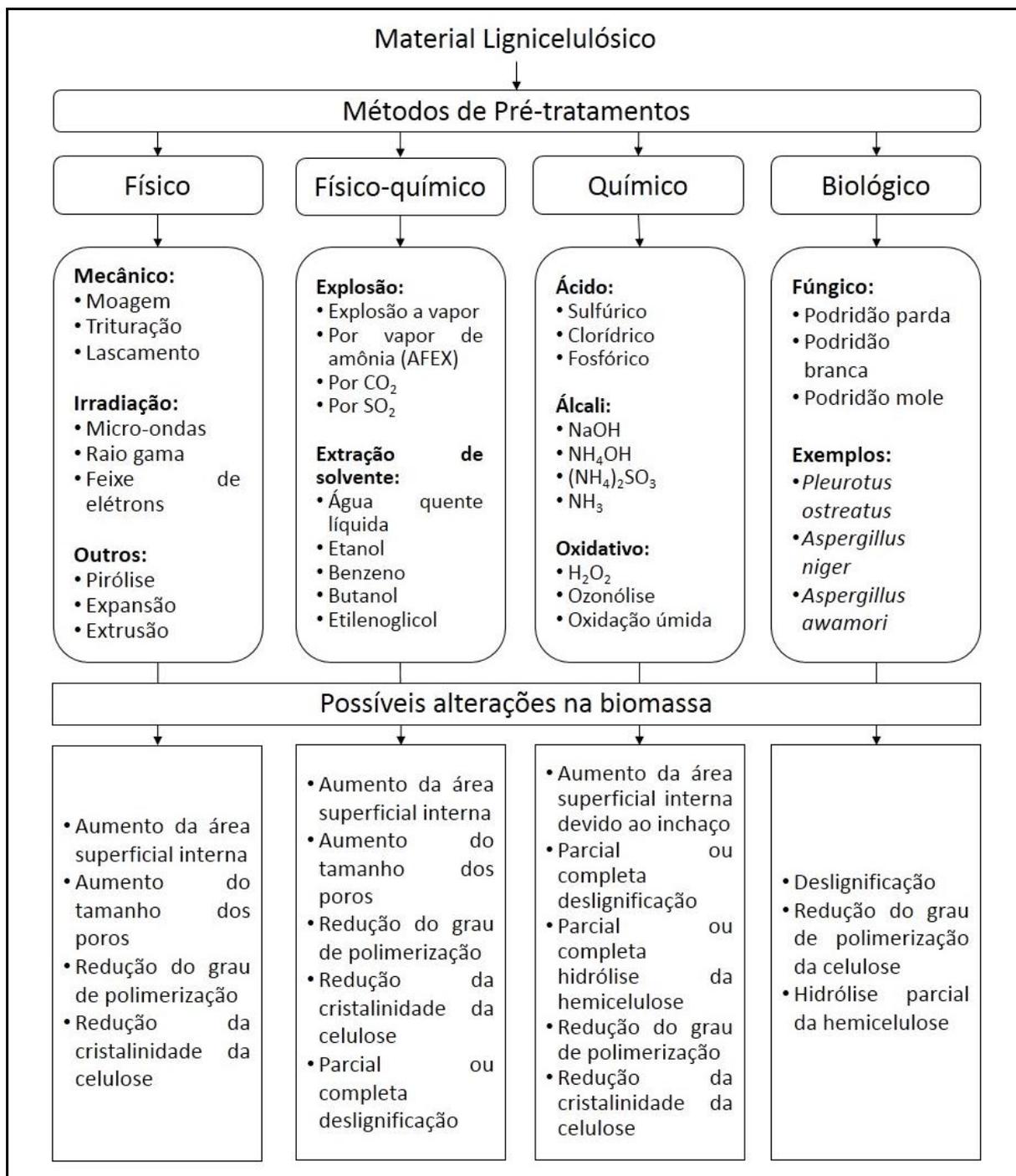
A Figura 6 mostra esquematicamente as estruturas do complexo lignocelulósico antes e após um pré-tratamento genérico.

Figura 6 – Desconstrução do complexo lignocelulósico após etapa de pré-tratamento.

Fonte: Adaptado de US DOE (2007) e MOSIER (2005)

Os pré-tratamentos dos materiais lignocelulósicos podem ser basicamente classificados em processos físicos, físico-químicos, químicos e biológicos, como exemplificado para a palha de trigo na Figura 7. Entretanto vários métodos utilizam a combinação de diferentes princípios como, o físico junto com térmico e químico, a fim de obter melhor eficiência (TALEBNIYA; KARAKASHEV; ANGELIDAKI, 2010).

Figura 7 – Métodos de pré-tratamentos comumente utilizados e seus respectivos efeitos.



Fonte: Adaptado de TAHERZADEH; KARIMI (2008) e TALEBNIA; KARAKASHEV; ANGELIDAKI (2010)

A etapa de pré-tratamento é realizada propondo alterar essa estrutura complexa para promover uma melhora no rendimento e na taxa de produção de açúcares fermentescíveis liberados na etapa de hidrólise enzimática (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). Para isso, deve ocorrer a remoção e/ou redistribuição de lignina da biomassa, a redução da cristalinidade da

fração celulósica e o aumento da porosidade do material, tornando mais acessíveis a celulose e a hemicelulose à hidrólise (SUN; CHENG, 2002).

A eficiência do processo de pré-tratamento está relacionada a um balanço adequado entre melhora na formação de açúcares fermentescíveis ou produção de fibras propícias ao ataque enzimático e a fatores como: evitar a degradação ou perda das frações de celulose e hemicelulose, evitar a formação de subprodutos inibitórios à hidrólise enzimática e fermentação e ser rentável, com baixo consumo de energia e baixo ou nenhum consumo de químicos (SUN; CHENG, 2002; TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

2.4.1. Pré-tratamento com peróxido de hidrogênio/ácido acético

O pré-tratamento oxidativo consiste na utilização de um composto oxidante sobre a biomassa suspensa em água. Os compostos peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido peracético (CH_3CO_3H), composto formado juntamente com água (H_2O) na reação do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) com ácido acético (CH_3CO_2H), são reconhecidos como agentes oxidantes eficazes na remoção da hemicelulose e lignina, aumentando a acessibilidade à celulose, isolando e branqueando as fibras para posterior utilização no processamento do papel (BRAGATTO; SEGATO; SQUINA, 2013; TEIXEIRA; LINDEN; SCHROEDER, 2000)

Durante o pré-tratamento oxidativo ocorrem diversas reações como a substituição eletrofílica, o deslocamento das cadeias laterais e a clivagem oxidativa do núcleo dos anéis aromáticos. Este pré-tratamento tem sido utilizado para melhorar a digestibilidade enzimática da biomassa, podendo ser realizado a temperaturas moderadas (60 a 100°C) (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009).

A ação oxidativa pode ser em alguns casos não seletiva devido ao composto oxidante utilizado, o que irá acarretar em perdas de celulose e hemicelulose. O ácido peracético possui ação oxidativa fortemente seletiva para a estrutura de lignina, resultando na remoção desta, com baixa solubilização da hemicelulose (HENDRIKS; ZEEMAN, 2009). A biomassa pré-tratada com peróxido de hidrogênio apresenta um aumento na acessibilidade da hemicelulose e celulose para ação enzimática e a clarificação do material lignocelulósico (SUN; CHENG, 2002; ZHAO; ZHANG; LIU, 2012).

2.4.2. Pré-tratamento organossolve

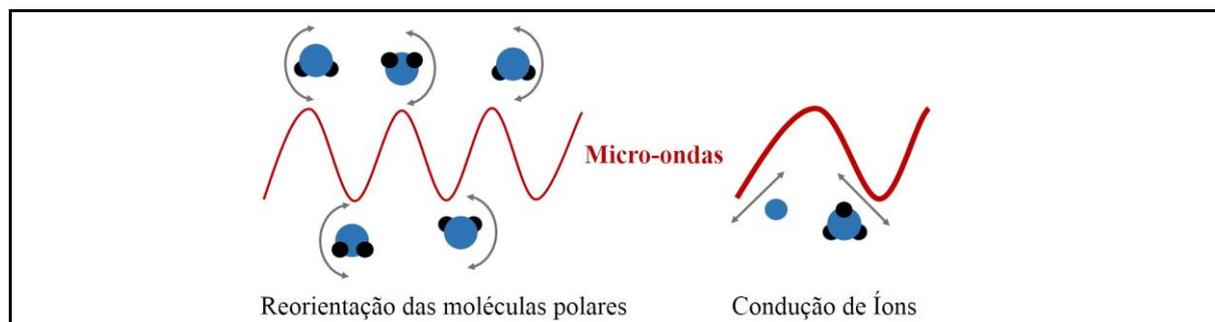
No pré-tratamento termoquímico organossolve, um solvente orgânico ou uma mistura de solvente orgânico em água, com a possibilidade de uso de aditivos catalíticos (ácidos ou álcalis), são utilizados em elevadas temperaturas, para desfazer as ligações internas de hemicelulose e lignina (DUFF; MURRAY, 1996). A eficiente extração de lignina com elevado grau de pureza e baixas concentrações de cinzas e enxofre permite este composto ser utilizado como fonte de compostos fenólicos e outros produtos, além da queima para geração de energia. Destaca-se neste processo a solubilização da hemicelulose na forma de xilanas e oligômeros, com baixa formação de compostos inibitórios provenientes da degradação de açúcares (DE LA TORRE et al., 2013; MESA et al., 2011; ZHANG; TU; PAICE, 2011).

A remoção dos solventes após o pré-tratamento é imprescindível por dois fatores: para reuso, após evaporação e condensação, reduzindo custos; e para evitar a inibição nas etapas seguintes de hidrólise enzimática e fermentação (BRANDT et al., 2013a; KESHWANI, 2010).

2.4.3. Reator micro-ondas

A irradiação micro-ondas tem sido amplamente estudada devido a suas vantagens de baixo custo energético, ausência da necessidade de grandes equipamentos, ausência de geração de resíduos e, principalmente, por sua alta eficiência de aquecimento, que ocorre de forma uniforme e controlada, com capacidade de iniciar e parar a reação instantaneamente. Exemplos de sua aplicação nos campos da síntese orgânica e catálise química são vastos, podendo também ser aplicados no processamento de alimentos, secagem de madeira, extração de produtos naturais e no tratamento da biomassa lignocelulósica (BIAN et al., 2014; ZHU et al., 2006).

O calor gerado pela irradiação micro-ondas (Figura 8) ocorre devido ao aumento vibracional das moléculas. As moléculas com estrutura polar se alinham no campo eletromagnético gerado por micro-ondas, reorientando-se com movimentos moleculares e, portanto, sofrendo aquecimento. O aquecimento por condução sobre os íons (como sais) ocorre por oscilações semelhantes às moléculas polares, devido a absorção micro-ondas, mas em frequências mais baixas (SAXENA; CHANDR, 2011).

Figura 8 – Esquemática do mecanismo de aquecimento por irradiação micro-ondas.

Fonte: Adaptado de ANTON PAAR GmbH (2015)

A aplicação da irradiação micro-ondas como aquecimento confere maior eficiência na hidrólise enzimática, acelerando a reação; como pré-tratamento da biomassa, a irradiação cria zonas de altas temperaturas capazes de romper parcialmente a estrutura lignocelulósica e promover a desintegração da mesma (BIAN et al., 2014; SAXENA; CHANDR, 2011).

A Tabela 1 lista alguns trabalhos reportados na literatura sobre o uso de micro-ondas em pré-tratamento e hidrólise de biomassas lignocelulósicas.

Tabela 1 – Comparativo de trabalhos existentes na literatura que utilizam irradiação micro-ondas (M-O).

Biomassa	Procedimento e Conclusão	Referência
Casca de Soja	<p align="center">Pré-tratamento com M-O:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Potência do M-O: 90, 180, 270, 360 e 450 W; • Tempo de procedimento: 2.5, 5, 7.5, e 10 min. 	KARUPPUC HAMY & MUTHUKUM ARAPPAN (2009)
	<ul style="list-style-type: none"> ▪ A potência da irradiação M-O teve efeito significativo; ▪ Os melhores índices de hidrólise foram obtidos com potência de 360 W por 2,5 min. 	
Palha de Arroz	<p align="center">Hidrólise Enzimática em reator micro-ondas:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Temperatura: 45, 50 e 55°C; • Conc. Enzimática (Celulase): 10, 20 e 30 mg; 	ZHU et al. (2006)
	<ul style="list-style-type: none"> • Avaliação da combinação de irradiação micro-ondas com pré-tratamento alcalino (NaOH 1%). ▪ A irradiação M-O intermitente acelerou o início da hidrólise, mas diminuiu o rendimento; ▪ Pré-tratamento combinado (irradiação M-O + NaOH 1%) acelerou a hidrólise inicial. 	

Pré-tratamento com M-O:

Bagaço de cana-de-açúcar	<ul style="list-style-type: none"> • Bagaço imerso em: água destilada, ácido fosfórico (pH 3) ou glicerol (100%); • 5 min de irradiação a 2450 MHz. <hr style="width: 100%;"/> <ul style="list-style-type: none"> ▪ O uso do glicerol possibilitou remover maior quantidade de lignina e hemicelulose ▪ A estrutura de celulose foi mantida, possibilitando maior rendimento na etapa de hidrólise. 	MORETTI et al. (2014)
--------------------------	---	-----------------------

2.5. Enzimas

As enzimas são moléculas orgânicas, constituídas por longas cadeias formadas por aminoácidos que se encontram unidos por ligações peptídicas. Em sua maioria as enzimas são de natureza proteica, com exceção de um grupo de moléculas de RNA que possuem propriedades catalíticas (LENINGHER et al., 1995).

Produzidas por células vivas (animal, vegetal e microrganismos) e com atividade intra ou extracelular, as enzimas geralmente atuam em condições amenas de pH e temperatura, desempenhando importantes funções na regulação da via metabólica dos organismos. Com a capacidade de catalisar reações químicas que na sua ausência não ocorreriam ou se realizariam de forma lenta, as enzimas são biocatalisadores altamente específicos, pois devido a sua estrutura terciária são capazes de distinguir seu substrato de moléculas com estruturas semelhantes (LENINGHER et al., 1995).

Pode-se dividir as enzimas em seis grandes classes, de acordo com a reação catalisada: 1. Oxidoredutases (reações de oxidação-redução), 2. Transferases (reações de transferência de grupos entre moléculas, que não sejam catalisadas pelas oxidoredutases ou pelas hidrolases), 3. Hidrolases (reações de hidrólise, sendo a água o receptor dos grupos transferidos), 4. Liases (reações de eliminação de grupos, desfazendo ligações duplas), 5. Isomerases (reações de isomerização; modificam uma única molécula sem participação de outra) e 6. Ligases (catálise da síntese de uma nova molécula a partir da ligação de duas moléculas com hidrólise simultânea de ATP) (KENNEDY, 1987).

2.5.1. Hemicelulases

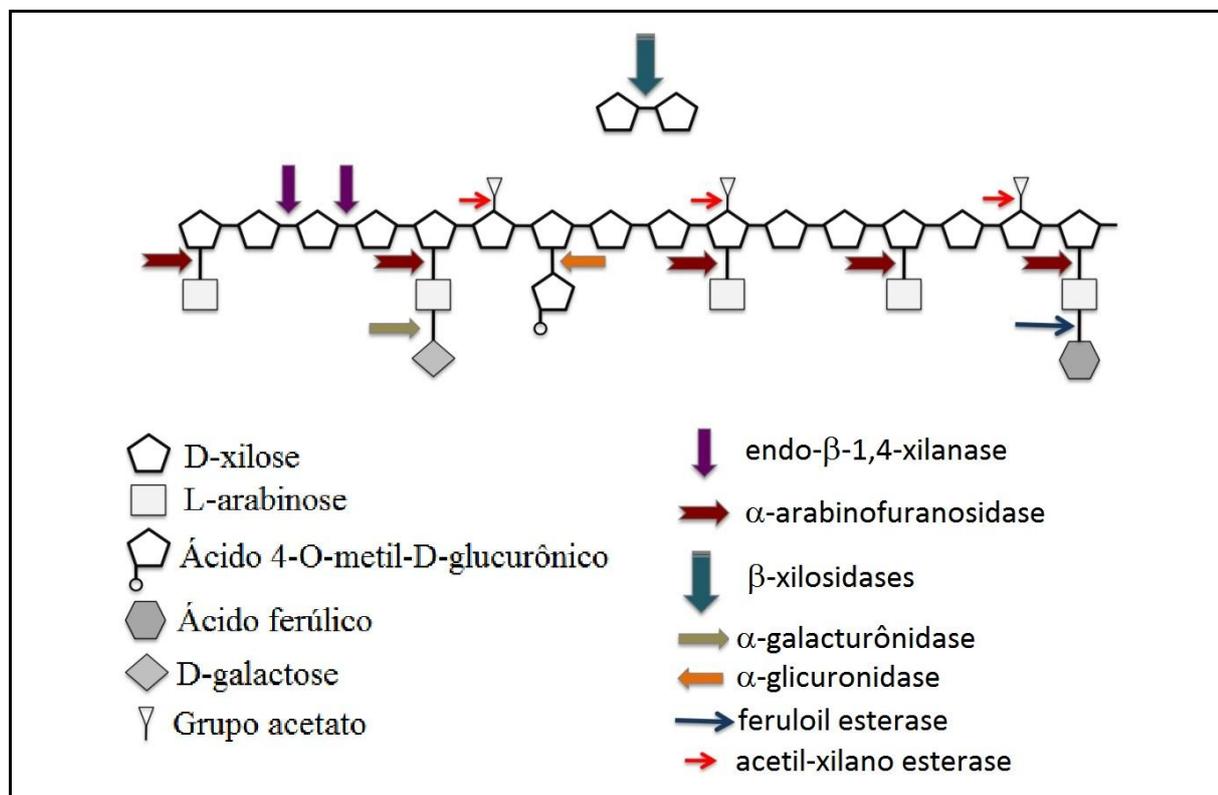
Devido à variedade de compostos presentes na hemicelulose, diversas enzimas participam para a degradação das cadeias laterais e da cadeia principal da hemicelulose.

Fazem parte deste complexo as endoxilanasas (EC 3.2.1.8), que liberam xilooligossacarídeos ao hidrolisar randomicamente as ligações β -1,4 glicosídicas da cadeia principal da hemicelulose, as exoxilanasas ou β -xilosidades (EC 3.2.1.37) complementam a ação das endoxilanasas hidrolisando xilooligossacarídeos curtos em xilose. As α -arabinofuranosidase (EC 3.2.1.55) são principalmente exo-enzimas que liberam arabinose quebrando ligações α -1,2 , α -1,3 e α -1,5 que ligam a arabinose à cadeia principal da xilana, formando arabinoxilana, arabioglucoxilanas e arabinanas (DUMON et al., 2012).

Classificadas como enzimas acessórias, mas necessárias na degradação da hemicelulose, estão a α -galacturônidase, que age liberando galactose da hemicelulose, a α -glicuronidase, que remove o ácido 4-O-metil-D-glucurônico, a feruloil esterase, que libera o ácido ferúlico e a acetil-xilano esterase, que atua removendo os grupos acetatos da hemicelulose (DE SOUZA, 2013).

Assim, a hidrólise da hemicelulose por estas enzimas (Figura 9) ocorre de forma aleatória, produzindo xilo-oligossacarídeos heterogêneos de cadeias lineares e ramificadas, podendo conter cadeias laterais de arabinofuranose, ácido glicurônico ou ácido 4-O-metil-glicurônico (DE SOUZA, 2013; ZHANG; TU; PAICE, 2011).

Figura 9 – Representação da ação das hemicelulases na degradação da hemicelulose.



Fonte: Adaptado de DE SOUZA (2013)

2.5.2. Xilanases

As xilanases são enzimas especializadas na degradação do polímero de xilana, hidrolisando as ligações glicosídicas β -1,4; geralmente são produzidas por microrganismos para a degradação da parede celular (RAMALINGAM; HARRIS, 2010).

As principais enzimas responsáveis pela despolimerização da cadeia de xilana são as endo- β -1,4-xilanases (EC 3.2.1.8), responsáveis por clivar a cadeia principal da xilana em oligossacarídeos menores, e as β -xilosidades (EC 3.2.1.37), que clivam as pontas não redutoras dos oligossacarídeos em monômeros de xilose (WONG; TAN; SADDLER, 1988).

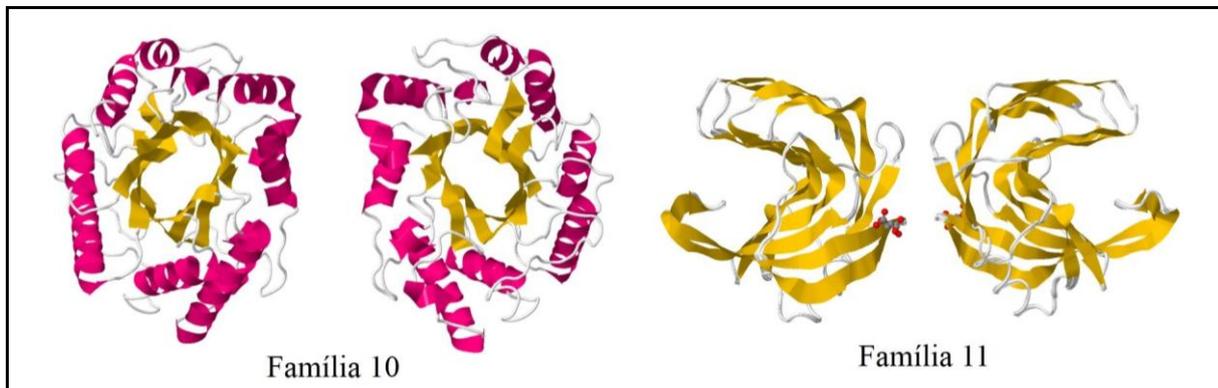
As endoxilanases podem ser classificadas em duas famílias principais, a família 10 e a família 11. A família 10 possui como principais características uma alta massa molecular (>30 kDa) e valores baixos de ponto isoelétrico; em contrapartida a família 11 contém enzimas de baixa massa molar (<30 kDa) e altos valores de ponto isoelétrico (COLLINS; GERDAY; FELLER, 2005). A Tabela 2 mostra as principais diferenças entre as endoxilanases pertencentes às famílias 10 e 11, e a Figura 10 apresenta as estruturas tridimensionais de xilanases representantes dessas famílias.

Tabela 2 – Comparação entre as endoxilanases das Famílias 10 e 11.

<i>Família 10</i>	<i>Família 11</i>
Maior versatilidade	Menor versatilidade
Menor especificidade	Maior especificidade
Moléculas maiores e esparsas	Moléculas menores e compactas
Maior flexibilidade conformacional	Menor flexibilidade conformacional
Menor profundidade do sítio ativo	Maior profundidade do sítio ativo

Fonte: Adaptado de COLLINS; GERDAY; FELLER (2005)

Figura 10 – Representação da estrutura tridimensional típica das endoxilanases das famílias 10 (produzida por *Streptomyces lividans*) e 11 (produzida por *Trichoderma reesei*).

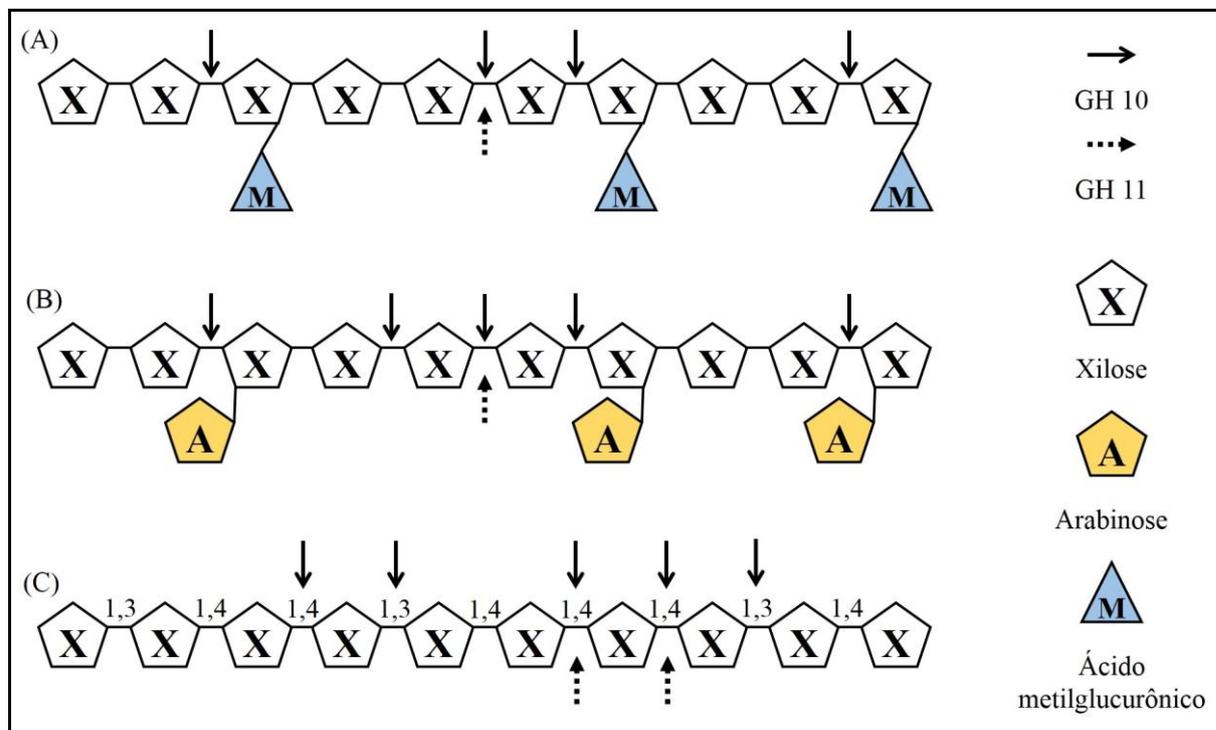


Fonte: Adaptado de DEREWENDA (1994) e MURAKAMI (2005)

Apesar de ambas endoxilanases apresentarem preferências em atacar as ligações glicosídicas β -1,4 internas da xilana, elas possuem diferentes especificidades de substratos, resultando na formação de diferentes produtos. As endoxilanases da família 10, com menor especificidade ao substrato, são capazes de atacar as ligações glicosídicas próximas a pontos de ramificação e da extremidade não redutora da cadeia, liberando xilo-oligossacarídeos lineares mais curtos (em alguns casos xilose). As endoxilanases da família 11 mostram uma preferência em atacar regiões menos substituídas, liberando fragmentos de xilo-oligossacarídeos maiores (DUMON et al., 2012; POLLET; DELCOUR; COURTIN, 2010).

A Figura 11 ilustra o mecanismo de ação de endoxilanases dessas duas famílias.

Figura 11 – Representação do mecanismo de ação das xilanases das famílias 10 (GH10) e 11 (GH11) em substrato de (A) glucuronoxilana, (B) arabinoxilana, e (C) xilana com ligações mistas de β -1,3 e β -1,4. As setas indicam os locais potenciais de hidrólise; os pentágonos com (X) representam as unidades de xilose ligadas por ligação glicosídica β -1,4 (e β -1,3 quando indicado); os triângulos com (M) representam as unidades ácido metilglucurônico; os pentágonos com (A) representam as unidades de arabinose.



Fonte: Adaptado de POLLET; DELCOUR; COURTIN (2010)

2.6. Xilo-oligossacarídeos

Xilo-oligossacarídeos (XOS) são polímeros de cadeia curta (2 a 7 unidades de xilose e suas variações, tais como arabino-xilooligossacarídeos) (NABARLATZ; EBRINGEROVÁ; MONTANÉ, 2007), presentes naturalmente em frutos, vegetais, leite e mel.

Os XOS, preferencialmente os que possuem de 2 a 4 unidades de xilose, são importantes insumos para a indústria de alimentos e de fármacos, são substâncias alimentares não digeridas pelas enzimas humanas, classificados como ingredientes prebióticos, que oferecem benefícios à saúde humana, auxiliando no aumento da população de bactérias probióticas (bifidobactérias e bactérias lácteas) que metabolizam os XOS produzindo ácidos graxos de cadeia curta, responsáveis por melhorar a saúde do ser humano como um todo (BRAGATTO; SEGATO; SQUINA, 2013; VÁZQUEZ et al., 2000). Além disso, existem

trabalhos que reportam que o uso dos XOS contribuem para a redução do colesterol e de lesões pré-cancerosas, além de melhorar a disponibilidade biológica de cálcio (MADHUKUMAR; MURALIKRISHNA, 2010).

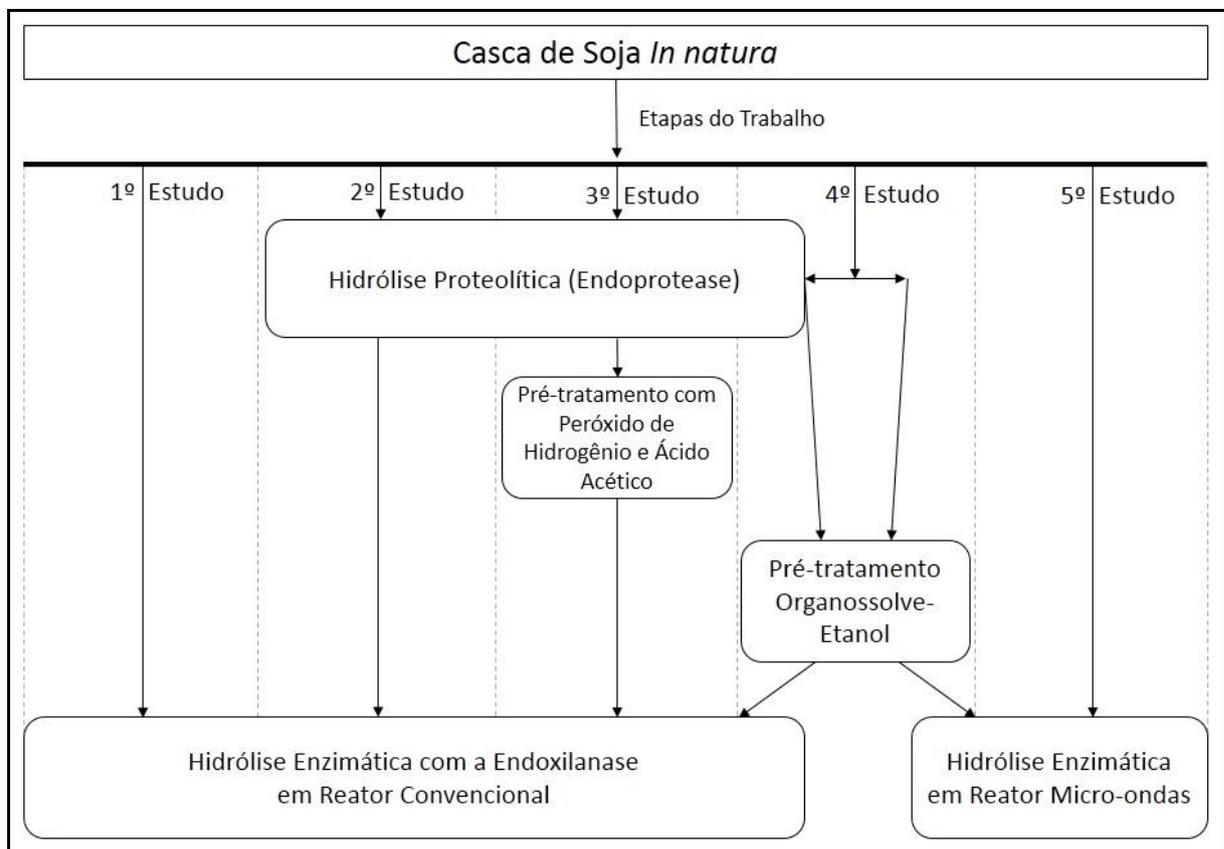
Industrialmente, os XOS podem ser obtidos a partir de materiais lignocelulósicos ricos em xilana, como resíduos florestais e subprodutos agroindustriais (fontes abundantes de biomassa lignocelulósica). A solubilização e/ou hidrólise da xilana, presente na fração hemicelulósica, em oligômeros de xilose, pode ser realizada por diferentes processos, tais como, auto-hidrólise em água líquida ou explosão a vapor, pré-tratamentos químicos em soluções ácidas diluídas ou oxidativas, extrações álcali diluída ou organossolve e hidrólise enzimática direta da biomassa (QING et al., 2013; VÁZQUEZ et al., 2000).

Dentre os diferentes processos de produção de XOS, a via enzimática, por ação de endoxilanasas, é a mais desejável devido à ausência de subprodutos gerados durante a hidrólise e baixa formação de monômeros de açúcares, sem o uso de equipamentos especiais, além de se tratar de um processo limpo que ocorre em condições amenas de pH e temperatura, podendo realizar o reuso das enzimas em alguns casos (imobilizadas). Em contrapartida o processo enzimático é facilmente inibido por compostos presentes na biomassa lignocelulósica, o que demanda a necessidade de pré-tratamento para a remoção destes compostos relacionados a defesa das plantas; outro importante fator é o custo das enzimas em comparação aos reagentes químicos (AACHARY; PRAPULLA, 2011; QING et al., 2013).

A Tabela 3 lista alguns trabalhos de produção enzimática (ou físico-química) de XOS a partir de resíduos lignocelulósicos, dentre eles, bagaço de cana-de-açúcar, um dos resíduos lignocelulósicos mais abundante no país. Dentre os trabalhos listados, a produção de XOS por hidrólise enzimática de bagaço de cana pré-tratado com peróxido/ácido acético e por hidrólise ácida em reator de micro-ondas se mostraram muito atrativas. Entretanto, particularmente para a hidrólise ácida, por realizar a quebra aleatória das ligações glicosídicas entre as unidades de xilose, pode ocorrer a liberação de grande quantidade de monômeros de xilose e a formação de subprodutos indesejáveis (BIAN et al., 2014). Dessa forma, neste trabalho objetivou-se a produção enzimática de XOS a partir de casca de soja (resíduo agroindustrial de grande importância no país) *in natura* e pré-tratada com peróxido/ácido acético ou organossolve/etanol, bem como a avaliação do aquecimento induzido por micro-ondas. Como a casca de soja contém grande quantidade de proteínas em sua composição, avaliou-se também a influência da solubilização proteolítica como um pré-tratamento da biomassa para a produção de XOS por ação da endoxilanasase recombinante de *Bacillus subtilis*. A Figura 12 ilustra as estratégias utilizadas neste estudo, a saber: (1) hidrólise

enzimática da casca de soja *in natura* usando a endoxilanase solúvel; (2) hidrólise da casca de soja *in natura* com endoprotease para solubilização e aproveitamento das proteínas, seguida por hidrólise da biomassa desproteïnizada com a endoxilanase solúvel; (3) pré-tratamento da casca de soja *in natura* com peróxido de hidrogênio e ácido acético para remoção de lignina, seguido por hidrólise da biomassa pré-tratada com a endoxilanase; (4) pré-tratamento da casca de soja *in natura* com organossolve-etanol para solubilização de hemicelulose e lignina, seguido por hidrólise das frações líquida e sólida com a endoxilanase solúvel; (5) hidrólise da casca de soja *in natura* com a endoxilanase solúvel em reator de micro-ondas.

Figura 12 – Fluxograma dos estudos realizados neste trabalho.



Fonte: Acervo pessoal

Tabela 3 – Produção de xilo-oligossacarídeos a partir de diferentes biomassas lignocelulósicas.

Biomassa	Pré-tratamento	Origem da xilanase	Produção de XOS	Referência
Caule de tabaco	Alcalino com KOH (24%) com NaBH ₄ (1%)	Endoxilanase comercial de <i>Aspergillus niger</i> obtida da AB Enzymes	114 mg XOS/g de biomassa	(AKPINAR et al., 2010)
Palha de arroz	Alcalino com NaOH (4%)	Enzima comercial Nutrase Xyla	~58 mg XOS purificado/g de biomassa	(WANG et al., 2011)
Sabugo de milho	Alcalino diluído com NaOH (1,25M)	β-xilanase purificada de <i>Aspergillus foetidus</i> MTCC 4898	~107,04 mg XOS/g de biomassa	(CHAPLA; PANDIT; SHAH, 2012)
Bagaço de cana-de-açúcar	Ácido acético (8,74M) e peróxido de hidrogênio (21,6M)	Xilanase recombinante de <i>Bacillus subtilis</i> cepa 168	~119,5 mg XOS/g de biomassa	(BRAGATTO; SEGATO; SQUINA, 2013)
Bagaço de cana-de-açúcar	Hidrólise em reator micro-ondas a 90°C com H ₂ SO ₄ a 0,24M	-	~290,2 mg XOS/g de biomassa	(BIAN et al., 2014)

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

Casca de soja foi doada pela IMCOPA – Importação, Exportação e Indústria de Óleos S.A (Araucária, PR); xilanase recombinante de *Bacillus subtilis* foi doada pela Empresa Verdartis (Ribeirão Preto, SP); endoprotease Novo-ProD[®] (subtilisina de *Bacillus licheniformis*) foi fornecida pela Novozymes[®] Latin America Ltda (Araucária, PR). Todos os produtos químicos (grau analítico) foram adquiridos da Synth (São Paulo, SP) e Quemis (São Paulo, SP). Padrões de xilose, xilana, celobiose, arabinose, ácido glucurônico, ácido galacturônico, hidroximetilfurfural e furfural foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Estados Unidos), ácido acético e ácido fórmico da Quemis e glicose da Synth. Para a análise dos xiloligossacarídeos foram utilizados padrões de xilobiose (X2), xilotriose (X3), xilotetraose (X4), xilopentose (X5) e xilohexose (X6) adquiridos da Megazymes (Irlanda).

3.2. Métodos

3.2.1. Caracterização química da casca de soja

A caracterização química da casca de soja quanto à concentração de extrativos, celulose, hemicelulose, lignina, pectina e cinzas foi realizada de acordo com os protocolos da NREL (National Renewable Energy Laboratory), descritos por SLUITER e colaboradores (2004a, 2004b). Esses protocolos foram validados para o bagaço de cana-de-açúcar por GOUVEIA e colaboradores (2009) e adaptados para a casca de soja por ROJAS et al. (2014).

3.2.1.1. Determinação do teor de extrativo

Os extrativos da casca de soja *in natura* foram quantificados por extração alcoólica em Soxhlet. Para determinação da concentração de extrativos presentes na biomassa, pesaram-se 11 g (base seca) de casca de soja em um cartucho de celulose, colocando este no aparelho de extração de Soxhlet. Em um balão extrator foi adicionado um volume de 500 mL de solução de etanol 95% (razão biomassa/solvente de 1:45), que posteriormente foi aquecido em manta térmica.

O sistema foi ajustado à temperatura de ebulição do etanol e permaneceu ligado durante o período de aproximadamente 8 h, até que não houvesse mais extrativos (líquido incolor). Em seguida, os cartuchos foram retirados e secos em estufa a 45°C até atingir massa constante.

A porcentagem de extrativos da biomassa foi calculada usando a Equação 1:

$$\%Extrativos = \left(\frac{M_{ci} - M_{cf}}{M_{ci}} \right) \cdot 100 \quad (1)$$

Onde:

m_{ci} = massa de casca de soja inicial no cartucho (g);

m_{cf} = massa de casca de soja final no cartucho (g).

3.2.1.2. Hidrólise ácida

Casca de soja (*in natura* sem extrativos, pré-tratada e hidrolisada com endoxilanase) foi submetida à hidrólise ácida na razão sólido/líquido de 1:10 (m/v). Em triplicata, 10 mL de solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 72% (m/m), pré-aquecido a 45°C, foram adicionados a 1g de biomassa, base seca (umidade inferior a 10%). A suspensão foi mantida em um banho termostático (Marconi, MA-184) à mesma temperatura do ácido para hidrólise do material por 7 min sob agitação constante com auxílio de um bastão de vidro. Após este período de tempo, a agitação foi interrompida e adicionou-se 50 mL de água. Todo o conteúdo foi transferido para um Erlenmeyer de 500 mL e um volume adicional de 225 mL de água foi usado para a transferência total do material sólido. Nesta etapa, a concentração de ácido sulfúrico ajustou-se para 3% (v/v). Os frascos Erlenmeyer foram tampados e a suspensão foi submetida à hidrólise a 121°C por 30 min em autoclave. Após o período de 30 min, os frascos foram retirados da autoclave e deixados resfriar à temperatura ambiente; após isto foi feita a filtração em funil de vidro com filtro qualitativo previamente pesado e seco em estufa a 105°C; o filtrado foi recolhido em balão volumétrico de 500 mL e seu volume completado com água de lavagem do sólido remanescente no filtro.

A solução do balão volumétrico foi utilizada para as análises de carboidratos, ácidos orgânicos, lignina solúvel, e produtos de degradação de hexoses, 5-hidroximetil-2-furaldeído (HMF) e de pentoses, 5-metilfurfural (MF). A fração sólida retida no papel de

filtro foi usada para determinação da lignina insolúvel e cinzas.

3.2.1.3. Determinação de lignina solúvel

Lignina solúvel em ácido foi quantificada por espectrofotometria a 280 nm em espectrofotômetro UV-visível (Ultrospec-2000). Cinco mililitros do filtrado da hidrólise ácida foram transferidos para um balão volumétrico de 100 mL, seguida da adição de 1,5 mL de NaOH 6,5 M. Esta solução foi homogeneizada e o volume completado para 100 mL com água destilada. A leitura da absorbância desta solução foi realizada em espectrofotômetro em 280 nm em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho ótico.

Para a determinação da concentração de lignina solúvel no hidrolisado ácido utilizou-se as Equações 2 e 3, que subtraem os produtos de degradação (HMF e MF) determinados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

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

$$A_p d = (C_1 \cdot \varepsilon_1) + (C_2 \cdot \varepsilon_2) \quad (3)$$

Onde:

A_t = absorbância do hidrolisado ácido em 280 nm;

A_{pd} = absorbância de HMF e MF em 280 nm, calculada pela Equação 3;

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

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

ε_1 = absortividade do MF (146,85 L/g);

ε_2 = absortividade do HMF (144 L/g).

3.2.1.4. Análise dos carboidratos e ácidos orgânicos

Os produtos da hidrólise ácida (glicose, xilose, arabinose, ácido acético, etc.) foram quantificados por cromatografia líquida (cromatógrafo Shimadzu SCL-10A equipado com detector de índice de refração RID 10-A), usando uma coluna Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm) da Bio-Rad a 45°C e ácido sulfúrico 5 mM como fase móvel a uma vazão de 0,6 mL/min.

As amostras foram previamente filtradas em cartuchos de extração Sep-Pack® C-18 Waters, para a remoção dos compostos fenólicos, e filtros de seringa com membranas de 0,22 µm de poro, para a remoção total de compostos particulados.

Para quantificar os carboidratos e ácidos orgânicos, curvas padrões foram construídas usando padrões de glicose (0,25 a 1 g/L), xilose (0,125 a 0,5 g/L) e arabinose, celobiose, ácido glucorônico, ácido acético, ácido fórmico e ácido galacturônico (0,0625 a 0,25 g/L).

Para calcular a concentração dos polissacarídeos a partir da concentração de açúcares monoméricos utilizou-se fatores de 0,88 (ou 132/150) para açúcares C-5 (xilose e arabinose) e 0,90 (ou 162/180) para açúcares C-6 (glicose, galactose e manose).

3.2.1.5. Análise de MF e HMF

Os produtos de degradação de açúcares (MF e HMF) foram quantificados por CLAE (cromatógrafo Shimadzu SCL-10A, equipado com detector UV SPD-10AV, comprimento de onda ajustado em 274 nm), utilizando uma coluna SunFire™ C18 (5 µm, 4,6 x 150mm) da Waters® a 30°C, e acetonitrila/água (1:8, v/v) com 1% (v/v) de ácido acético como fase móvel a uma vazão de 0,8 mL/min. Amostras da fração líquida da hidrólise ácida foram previamente filtradas em membranas de 0,22 µm de poro, para a total remoção das partículas sólidas.

As concentrações de HMF e MF foram determinadas a partir de curvas de calibração de concentração de 0,01, 0,02, 0,03 e 0,04 g/L, construídas a partir dos componentes puros.

3.2.1.6. Determinação da lignina insolúvel

Os sólidos retidos na filtração da solução da hidrólise ácida, juntamente com o filtro, foram lavados com 2 L de água destilada para remoção total de H₂SO₄ e secos à 105°C em estufa até massa constante.

O cálculo da porcentagem de lignina (m/m) foi feito com relação à massa de amostra inicial, descontando-se a quantidade de cinzas presente no material sólido remanescente da hidrólise ácida, usando a Equação 4.

$$\%Lignina_{insolúvel} = \left(\frac{M_{filtrado} - M_{cinzas}}{M_{biomassa}} \right) \cdot 100 \quad (4)$$

$M_{filtrado}$ = massa de sólidos retidos no filtro, base seca (g);

M_{cinzas} = massa de cinzas (g);

$M_{biomassa}$ = massa de biomassa (casca de soja), base seca, submetida à hidrólise ácida (g).

3.2.1.7. Determinação de cinzas

As análises de determinação de cinzas foram feitas para todas as amostras de material sólido usado na quantificação de lignina insolúvel. O material sólido resultante da determinação da lignina insolúvel foi colocado cuidadosamente em um cadinho, previamente calcinado e tarado. Os cadinhos foram submetidos à incineração em uma mufla (7000, EDG equipamentos), por 1 h a 400°C, e sequencialmente por 2 h a 800°C. Os cadinhos contendo as cinzas foram retirados da mufla, mantidos em dessecador até resfriamento à temperatura ambiente e então pesados. A massa de cinzas (diferença entre cadinho com amostra e cadinho vazio) foi usada no cálculo da lignina insolúvel.

3.2.1.8. Determinação do teor de proteínas

A composição proteica das frações sólidas e líquidas foi determinada pelo método de Kjeldahl usando destilador de nitrogênio Buchi 323 e um fator de 6,25 para o cálculo da concentração de proteínas da soja (COTTA et al., 2007; LABCONCO, 1998).

O procedimento consistiu em quatro etapas:

- **Digestão da amostra:** aos tubos de digestão foram adicionados 1 g de catalisador ($\text{CuSO}_4 \cdot \text{K}_2\text{SO}_4$, 1:10, m/m) e aproximadamente 200 mg de biomassa, seguida da adição de 10 mL de ácido sulfúrico concentrado. Posteriormente, os tubos foram introduzidos no bloco digestor e mantidos por 150 min a uma temperatura aproximada de 250°C. Após a digestão, as amostras foram resfriadas até temperatura ambiente.

- **Destilação:** os tubos contendo as amostras digeridas foram colocados no destilador de nitrogênio Buchi 323, e em seguida adicionou-se 25 mL de água destilada e uma solução de NaOH 10 M até surgimento de uma coloração preta. Posteriormente, as amostras foram destiladas por um tempo de 8 min e a amônia liberada foi retida em um Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de ácido bórico 20 g/L e 3 gotas de indicador misto (vermelho de metila e verde de bromocresol).

- **Titulação:** a amônia recolhida nos frascos Erlenmeyer foi titulada com uma solução padronizada de HCl 0,01 M e o volume gasto foi utilizado no cálculo do nitrogênio total das amostras.

O teor de proteínas total nas amostras líquidas foi calculado utilizando-se as Equações 5 e 6:

$$C_N(g/L) = \frac{V_{HCl} \cdot C_{HCl} \cdot 14}{V_{amostra}} \quad (5)$$

$$Proteína(g/L) = C_N(g/L) \cdot 6,25 \quad (6)$$

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 (M);

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.

3.2.1.9. Determinação de umidade

Umidade foi determinada em uma balança de determinação de umidade ID50 – Marte a partir de 1 g de material utilizando o modo de secagem automático, onde a amostra foi seca por aquecimento de uma resistência infravermelha encapsulada em vidro até que não houvesse mais variação do peso, trabalhando na faixa de temperatura de 60 a 180°C com incremento de 1°C.

3.2.1.10. Análise granulométrica

Para a determinação do tamanho de partículas entre 7 cm e 40 μ m, o método mais prático é peneiramento, que consiste na passagem das partículas por uma série de peneiras com malhas progressivamente menores, na qual uma amostra de peso conhecido é colocada sobre a peneira de maior tamanho da malha e o sistema de peneiras é então vibrado mecanicamente por um intervalo de tempo em torno de 20 min. Terminado o ensaio, o material retido em cada peneira é pesado separadamente e relacionado com a abertura da malha que o reteve (GOMIDE, 1983). A classificação granulométrica da casca de soja *in natura* foi realizada em um conjunto de 4 peneiras da marca Bertel com aberturas de 10, 20, 42 e 80 mesh, ou seja, de 2,00 a 0,18 mm. O conjunto de peneiras foi submetido a vibração mecânica por 20 min, sendo em seguida pesadas as massas de material retido em cada

peneira.

3.2.1.11. Cálculo do rendimento mássico

Os rendimentos mássicos das etapas de hidrólise proteolítica e pré-tratamentos (peróxido/ácido acético e organossolve-etanol) da casca de soja foram calculados utilizando-se a Equação 7.

$$\eta = \left(\frac{m_{final}}{m_{inicial}} \right) \cdot 100 \quad (7)$$

Onde:

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

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

η = rendimento mássico da etapa.

3.2.2. Hidrólise proteolítica

As proteínas da casca de soja foram hidrolisadas com a endoprotease Novo-ProD[®] de acordo com a metodologia descrita por ROJAS et al. (2014). Sucintamente, casca de soja foi suspensa em água destilada (razão sólido/líquido de 1:10, m/v) e agitada mecanicamente à 60°C. Ajustou-se o pH da suspensão para 9,0 com solução de NaOH 5 M e adicionou-se a endoprotease (1%, massa de enzima/massa de proteína presente na casca de soja), reagindo durante 5 h. O pH da reação foi monitorado e controlado em um titulador automático StatTitrino modelo 718 (Metrohm Ltda, Suíça) com uma solução de NaOH 1 M.

Ao final da hidrólise, a fração sólida foi recuperada por filtração, lavada com água destilada e seca em estufa a 45°C, para posterior caracterização química, determinação de umidade, cálculo de rendimento mássico da hidrólise e utilização em pré-tratamento seguintes. A fração líquida foi armazenada em freezer para conservação das proteínas.

3.2.3. Pré-tratamento com peróxido de hidrogênio/ácido acético

A ação deste pré-tratamento sobre a casca de soja *in natura* foi avaliada variando-se o tempo de reação (1, 3, 6 e 9 h), usando-se as concentrações de H₂O₂ e ácido acético de 2,16 M e 8,74 M, respectivamente.

Após determinar o melhor tempo de reação, os pré-tratamentos foram realizados utilizando casca de soja após hidrólise proteolítica, variando-se as concentrações de H₂O₂ e de ácido acético conforme a Tabela 4.

Tabela 4 – Concentrações de H₂O₂ e ácido acético utilizadas nos pré-tratamentos da casca de soja desproteinizada a 60°C, 250 rpm, razão sólido/líquido de 1:20 (m/v), 1 h.

Ensaio	H ₂ O ₂ (M)	Ácido acético (M)
1	10	0
2	5	0
3	4,6	0,8
4	4,2	1,5

Todos os pré-tratamentos com H₂O₂/ácido acético foram realizados em Shaker a 60°C com agitação em torno de 250 rpm, usando uma razão sólido/líquido de 1:20 (m/v). Ao final do pré-tratamento, a fração sólida foi filtrada e lavada com água destilada para a remoção da lignina solubilizada e neutralização do pH. A biomassa foi pesada e a umidade determinada para o cálculo do rendimento mássico do pré-tratamento. A biomassa pré-tratada foi mantida congelada para uso posterior na hidrólise enzimática.

3.2.4. Pré-tratamento com organossolve-etanol

O pré-tratamento organossolve-etanol (etanol/água nas razões de 50 ou 70%, v/v) foi realizado em um reator PARR 4848 de alta pressão com capacidade de 5 L, razão sólido/líquido de 1:10 (m/v). Após o fechamento do reator e das válvulas de pressão, o aquecimento foi ligado, monitorado a rampa de aquecimento e o intervalo de tempo até atingir-se a temperatura programada de 170°C. A partir deste momento, iniciou-se a contagem do tempo de reação de 60 min.

Ao final da reação, a solução ainda quente, foi filtrada em peneira de 20 mesh, separando a fração sólida do sobrenadante (licor negro). A fração sólida foi lavada com 600

mL de solução etanol/água a 60°C, nas mesmas razões utilizadas no pré-tratamento, para a remoção da lignina solubilizada. Após a lavagem, o líquido utilizado neste processo foi descartado e a fração sólida foi lavada abundantemente com água destilada para a remoção total da lignina solubilizada e neutralização do pH. Esta biomassa, após pesagem e determinação da umidade para cálculo do rendimento mássico, foi mantida congelada até posterior utilização na etapa de hidrólise enzimática.

O licor negro, coletado na primeira filtração, foi rotaevaporado para recuperação do etanol, ressuspenso em água destilada para o volume inicialmente coletado de filtrado e centrifugado para precipitação da lignina. A fração solúvel foi congelada para uso posterior na etapa de hidrólise enzimática.

3.2.5. Hidrólise enzimática de biomassas com endoxilanase

As hidrólises enzimáticas das biomassas (casca de soja *in natura* ou pré-tratadas) foram conduzidas em batelada em reator convencional (Figuras 13 e 14) e em reator micro-ondas Discover[®] da CEM Co. (Figuras 15 e 16), ambos termostatizados a 45°C, sendo que em reator micro-ondas foi utilizada uma potência média de 7,5 W para manter a temperatura. A biomassa foi suspensa em tampão citrato de sódio 50 mM (pH 5,5) em uma razão sólido/líquido de 1:11 (m/v), seguida por agitação mecânica de aproximadamente 400 rpm para o reator convencional e de 1000 rpm para o reator micro-ondas (devido ao tamanho reduzido do impelidor). As cargas enzimáticas avaliadas foram de 40, 80 e 100 U/g de biomassa (alimentação no início da reação) como estudado por CHAPLA e colaboradores (2012), e 40 U/g de biomassa, alimentada no início da reação, seguida de alimentação de 20 U/g a cada 12 h de reação, para avaliar se havia inibição enzimática. Amostras de 0,8 a 1,0 mL foram retiradas em diferentes intervalos de tempo para acompanhamento da reação pela formação de açúcares redutores (AR), quantificados pelo método do ácido 3,5-dinitrossalicílico (DNS) (MILLER, 1959). As absorbâncias das amostras foram medidas em 540 nm em espectrofotômetro (Ultrospec-2000) e a concentração de AR determinada a partir de uma curva padrão construída com soluções de xilose de até 1 g/L.

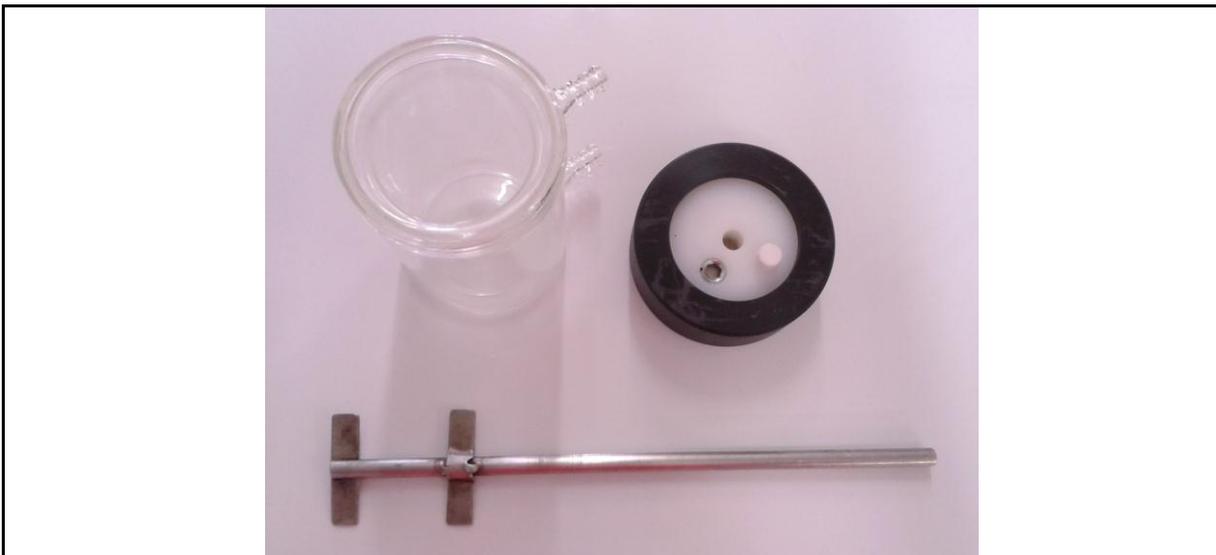
O tempo de hidrólise foi no mínimo de 12 h ou até a estabilização da concentração de AR solubilizados. Ao final das reações enzimáticas, todo o meio reacional foi filtrado a vácuo em filtro quantitativo, medindo-se o volume final de filtrado e a massa final de sólido para o cálculo dos rendimentos. As frações sólidas e líquidas foram caracterizadas quimicamente.

Figura 13 – Foto do reator convencional com tampa, aquecido por banho termostático e agitado mecanicamente, utilizado nas reações de hidrólise da casca de soja com endoxilanase solúvel.



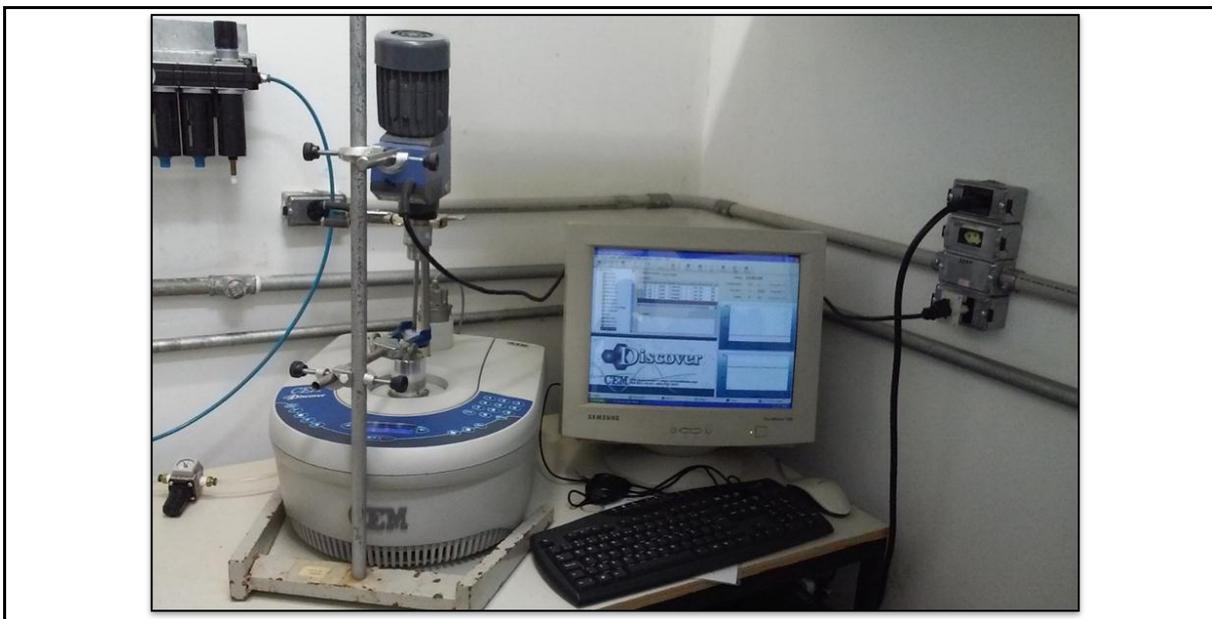
Fonte: Acervo pessoal

Figura 14 – Foto do reator convencional com tampa e impelidor utilizados nas reações de hidrólise da casca de soja com endoxilanase solúvel.



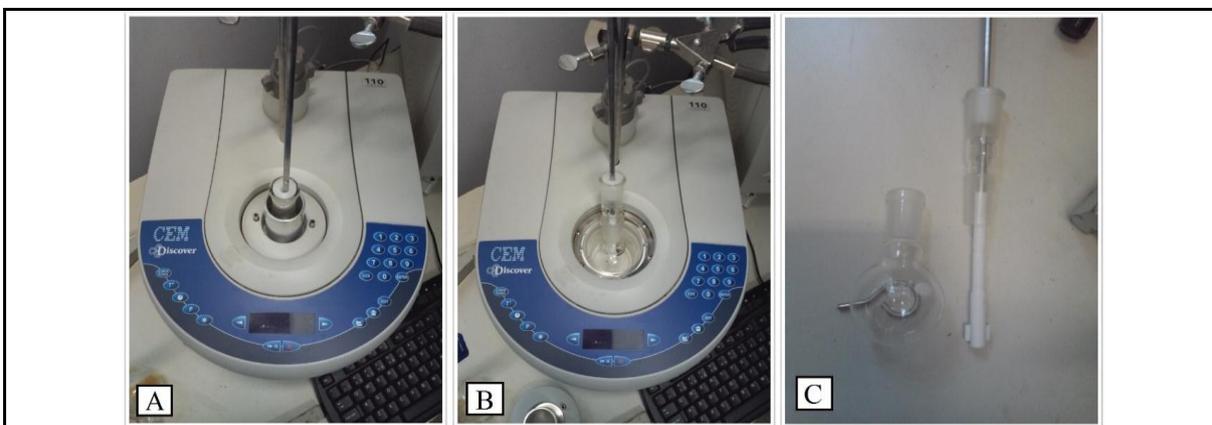
Fonte: Acervo pessoal

Figura 15 – Foto do reator micro-ondas Discover[®] da CEM Co. refrigerado a ar, com agitação mecânica e controlado por software computacional próprio para o aparelho.



Fonte: Acervo pessoal

Figura 16 – Foto da vista superior do reator micro-ondas Discover[®]; (A) com tampa fechada; (B) com tampa aberta; ambos com o balão reacional, extensor de vidro acoplado, impelidor de teflon com haste de alumínio e tampa de plástico (C).



Fonte: Acervo pessoal

3.2.6. Medida de atividade enzimática

A atividade enzimática de endoxilânase foi medida a 50°C, pH 5,5 (tampão citrato de sódio 50 mM), monitorando-se a formação de açúcares redutores por 10 min a partir de uma solução de xilana de bétula 1% (m/v) (BAILEY; BIELY; POUTANEN, 1992). Amostras do meio reacional foram retiradas em intervalos de 2 min para quantificação de AR

pelo método do DNS (Miller, 1959), medindo as absorvâncias em 540 nm e determinando as concentrações de açúcares redutores por meio de uma curva padrão construída com soluções de xilose de concentração máxima 1 g/L. Uma unidade de atividade (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de xilose por min (=16,67 nanokatal ou nkat) nas condições de ensaio (VYNOHRADOVA, 1979).

3.2.7. Influência da temperatura e do pH na atividade da endoxilanase

Endoxilanase recombinante de *B. subtilis* foi incubada em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5,5 a 45 e 50°C e as atividades residuais após 6 e 12 h de incubação foram medidas usando o protocolo padrão de medida de atividade.

A atividade enzimática da endoxilanase também foi medida a 45°C usando xilana de bétula 1% (m/v) preparada em tampão citrato de sódio, fosfato de sódio e tampão acetato de sódio, todos a 50 mM, variando o pH de 5,0 a 6,5 (BAILEY; BIELY; POUTANEN, 1992).

3.2.8. Análise dos carboidratos e ácidos orgânicos das frações líquidas

Para a quantificação dos carboidratos e ácidos orgânicos totais (monômeros de glicose, xilose, arabinose, ácido acético, etc.) das amostras líquidas, um volume de 5 mL da amostra foi submetido à hidrólise ácida com 174 μL de H_2SO_4 72% (v/v) em tubos de ensaio com tampa, mantidos em banho seco (Nova Ética) a 121°C por 1 h. Após a hidrólise da amostra, o pH dos hidrolisados ácidos foram ajustados entre 5 e 6 com carbonato de cálcio, a amostra foi então centrifugada e filtrada em filtros C18 Sep-Pak® e filtro de 0,22 μm de poro para análise das concentrações de carboidratos e ácidos orgânicos e filtro de 0,22 μm de poro para análise dos produtos de degradação de açúcares, MF e HMF, quantificados por CLAE.

3.2.9. Quantificação dos xilo-oligômeros e cálculo do rendimento de extração

Para quantificação dos xilo-oligômeros solubilizados durante o pré-tratamento organossolve-etanol é realizada inicialmente a quantificação da concentração de monômeros de xilose solúvel no licor negro, seguido da quantificação da xilose total, obtida após hidrólise ácida da fração líquida, como descrito no tópico 3.2.8.

Após hidrolisado os oligômeros de xilose a monômeros de xilose, o pH dos hidrolisados ácidos foram ajustados, a amostra foi então centrifugada e filtrada, e foi alisada as concentrações de xilose e MF, quantificados por CLAE.

A massa de xilo-oligômeros solubilizada foi determinada utilizando a Equação 8, a partir da massa total de xilose presente no hidrolisado enzimático (após hidrólise ácida), subtraída a massa de xilose livre presente inicialmente.

O rendimento de extração de xilo-oligômeros ($R_{xilo-oligômeros}$) foi calculado utilizando a Equação 9, como a razão entre massa total de xilo-oligômeros no hidrolisado ($M_{xilo-oligômeros}$) e massa total de xilose presente na biomassa submetida ao pré-tratamento (massa teórica total de xilose, M_{xT}).

O rendimento de extração de xilose (R_x) foi calculado utilizando a Equação 10, determinado pela razão de massa de xilose livre quantificada na fração líquida pela massa total de xilose presente na biomassa submetida ao pré-tratamento (massa teórica total de xilose, M_{xT}).

$$M_{xilo-oligômeros} = (M_{xH} - M_x) \quad (8)$$

$$R_{xilo-oligômeros} = \left(\frac{M_{xilo-oligômeros}}{M_{xT}} \right) \cdot 100 \quad (9)$$

$$R_x = \left(\frac{M_x}{M_{xT}} \right) \cdot 100 \quad (10)$$

Sendo, para as Equações 8, 9 e 10:

M_{xH} : massa de xilose total quantificada após hidrólise ácida (g);

M_x : massa de xilose livre quantificada na fração líquida (g);

M_{xT} : massa de xilose teórica presente na biomassa submetida a hidrólise enzimática (g);

$M_{xilo-oligômeros}$: massa de xilo-oligômeros (g);

$R_{xilo-oligômeros}$: rendimento de extração de xilo-oligômeros (%);

R_x : rendimento de extração de xilose (%).

3.2.10. Análise de XOS por cromatografia líquida de troca iônica

Os XOS foram identificados por cromatografia líquida de troca catiônica

(cromatógrafo Waters® modelo e2695 equipado com detector de índice de refração modelo 2414), usando a coluna Sugar-Pak™ I (6,5 x 300 mm) da Waters® a 80°C e água Milli-Q/EDTA de cálcio e sódio (0,5 g/L) como fase móvel a uma vazão de 0,5 mL/min. As amostras foram filtradas em filtro C18 Sep-Pak® e filtro de 0,22 µm de poro, para a total remoção de compostos fenólicos e partículas sólidas. As concentrações de X2, X3, X4, X5 e X6 foram determinadas a partir de curvas de calibração dos padrões nas concentrações de 100, 500, 1500 e 2000 mg/L.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização da endoxilanase comercial

BERNIER et al. (1983) reportaram que uma xilanase de *B. subtilis* possuía pH e temperatura ótimos de 5,0 e 50°C, respectivamente. RULLER et al. (2006) reportaram que uma xilanase de *B. subtilis* expressa em *Escherichia coli* DH5 α exibia atividade máxima a 55°C e pH entre 6,0 e 6,5. Dessa forma, a endoxilanase recombinante de *B. subtilis* utilizada neste trabalho, sem procedimentos de purificação ou diálise, teve as atividades enzimáticas medidas nos valores de pH de 5,5 e 6,5, para o tampão citrato de sódio e pH 6,5 para o tampão fosfato de sódio, ambos com força iônica de 50mM, como exemplifica a Tabela 5.

Tabela 5 – Influência do pH e do tampão na atividade enzimática da endoxilanase de *B. subtilis* a 45°C.

	pH 5,5 (Tampão citrato)	pH 6,5 (Tampão citrato)	pH 6,5 (Tampão fosfato)
Atividade (U/mL)	312,5	270,0	233,6

Observa-se na Tabela 5 que a atividade em pH 5,5 é superior em relação àquela medida no pH 6,5. Além disso, a atividade medida com o substrato preparado em tampão fosfato de sódio é em torno de 1,2 vezes menor àquela medida com o substrato preparado em tampão citrato de sódio.

As atividades da endoxilanase de *B. subtilis* foram também medidas após congelamento (para armazenagem) e descongelamento (para uso) da enzima, usando xilana de bétula 1% (m/v) preparada em tampões citrato e acetato de sódio 50 mM, pH variando de 5,0 a 6,5, como demonstrado na Tabela 6.

Tabela 6 – Influência do pH e do tampão na atividade enzimática da endoxilanase (descongelada) de *B. subtilis* a 45°C.

	pH 5,0	pH 5,5	pH 6,0	pH 6,5
Atividade (U/mL) em Tampão Acetato	101,2	155,6	209,0	-
Atividade (U/mL) em Tampão Citrato	177,1	241,1	244,6	235,9

Observa-se na Tabela 6 que o pH de máxima atividade da endoxilanase está em torno de 5,5-6,0. Além disso, as atividades medidas com o substrato preparado em tampão citrato de sódio são, em média, 1,5 vezes superiores às aquelas medidas com o substrato preparado em tampão acetato de sódio, sugerindo que o tampão citrato, o qual contém três grupos ionizáveis, tem um efeito positivo na atividade da endoxilanase.

Dessa forma, selecionou-se o pH 5,5 para as hidrólises da casca de soja (*in natura* ou pré-tratada), suspensas em tampão citrato de sódio 50 mM.

Comparando as atividades listadas nas Tabelas 5 e 6, observa-se que devido ao tempo de armazenagem e/ou congelamento/descongelamento do extrato enzimático, a atividade enzimática sofreu uma redução de 13 e 22%, quando medida em tampão citrato de sódio pH 6,5 e 5,5, respectivamente, sugerindo que o caldo enzimático não contém ou contém em baixa quantidade aditivos responsáveis pela estabilização da enzima, indicando a necessidade de uso breve do extrato enzimático.

A influência da temperatura na estabilidade térmica da endoxilanase foi avaliada nas temperaturas de 45 e 50°C, em tampão citrato de sódio 50 mM, pH 5,5, mostrado na Tabela 7.

Tabela 7 – Influência da temperatura na atividade da endoxilanase de *B. subtilis* a pH 5,5 (tampão citrato 50 mM).

	Tempo de incubação a 45°C		Tempo de incubação a 50°C		
	0 (Inicial)	6 h	12 h	6 h	12 h
Atividade (U/mL)	305,3	268,9	214,9	109,5	83,8
Atividade Relativa (%)	100,0	88,1	70,4	35,9	27,4

Os resultados da Tabela 7 mostraram baixa estabilidade da enzima a 50°C, restando apenas 27,4% da atividade inicial após 12 h de incubação. A 45°C, a estabilidade térmica mostrou-se adequada, com retenção de aproximadamente 70% da atividade inicial após 12 h de incubação. Dessa forma, selecionou-se a temperatura de 45°C para as reações de hidrólise das biomassas, já que estas foram realizadas por longos períodos de incubação (maior que 24h).

4.2. Caracterização da casca de soja *in natura*

A composição química da casca de soja pode variar em função da eficiência do processo de extração da casca, genética da soja, local e tempo de cultivo e variações climáticas. A casca de soja fornecida pela IMCOPA para a realização deste trabalho é de natureza não transgênica.

Na Tabela 8 são apresentadas as composições químicas da casca de soja *in natura* utilizada neste trabalho, bem como aquelas reportadas na literatura por ROJAS et al. (2014) (utilizando um lote diferente de casca fornecida pela IMCOPA), CASSALES et al. (2011) e MIELENZ et al. (2009).

Tabela 8 – Composição química da casca de soja *in natura*.

Componente	Concentração (% m/m, base seca)			
	Este trabalho ^a	ROJAS et al. (2014) ^b	CASSALES et al. (2011)	MIELENZ et al. (2009)
Celulose	34,7 ± 0,6	35,8 ± 0,6	31	29-51
Hemicelulose	19,8 ± 0,3	23,1 ± 0,4	26	10-20
Lignina solúvel em ácido	4,8 ± 0,9	4,3 ± 0,3	5,7	2-8
Lignina insolúvel	6,7 ± 0,4	4,8 ± 1,0	3,4	Nd
Extrativos	6,4 ± 0,4	5,0 ± 1,0	3,2	Nd
Cinzas	3,6 ± 0,1	4,0 ± 0,3	0,6	1-4
Proteínas	13,2 ± 0,7	15,4 ± 0,6	13,1	9-14
Pectinas	6,0 ± 0,4	4,2 ± 0,2	-	6-15
Total	95,2 ± 3,8	96,6 ± 4,4	-	-

^{a,b} Resultados são expressos como médias de triplicatas ± desvios padrões.

A composição química da casca de soja *in natura* utilizada neste trabalho está dentro da faixa de composições reportadas na literatura, como pode ser claramente visto na Tabela 8. O teor de celulose de 34,7% está dentro da faixa de valores reportados por MIELENZ et al. (2009) e muito próximo aos reportados por ROJAS et al. (2014) e

CASSALES et al. (2011). O teor de lignina total de 11,5% (4,8% de lignina solúvel e 6,7% de lignina insolúvel) mostrou-se um pouco superior ao teor de 9,1% reportado por CASSALES et al. (2011) e ROJAS et al. (2014). Entretanto, o teor de lignina na casca de soja é muito menor comparado àqueles de outros materiais lignocelulósicos, tais como, bagaço de cana-de-açúcar (~20%), madeira de eucalipto (~31%), palha de milho (~17,6%), madeira de pinus (~29,4%), palha de trigo (~23,4%) e gramíneas (~17,6%) (MOSIER, 2005; SAXENA; ADHIKARI; GOYAL, 2009).

A casca de soja *in natura* apresentou 19,8% de hemicelulose, valor esse com boa concordância aos reportados por MIELENZ et al. (2009) e ROJAS et al. (2014). Entretanto, um pouco abaixo do valor reportado por CASSALES et al. (2011). A hidrólise ácida deste heteropolímero mostrou que ele é composto de 73% de xilose, 19,2% de arabinose, 1,6% de ácido acético e 6,2% de MF, valores próximos ao encontrados por ROJAS et al. (2014), sendo 79,2% para xilose e MF e 23,8% para arabinose.

No que diz respeito ao teor de pectinas, 6,0%, está dentro da faixa de valores reportada por MIELENZ et al. (2009), 6-15%.

Estes resultados mostram que a casca de soja é uma biomassa de grande potencial, pois diversos produtos de interesse industrial poderiam ser obtidos a partir deste resíduo lignocelulósico, tais como etanol de segunda geração (a partir de celulose), xilooligossacarídeos (a partir da hemicelulose) e pectina. Este último carboidrato possui uma ampla gama de usos industriais, e é objeto de estudo por diversos grupos de pesquisa (GNANASAMBANDAM e PROCTOR, 1999; MONSOOR e PROCTOR, 2001), os quais visam otimizar o isolamento da pectina a partir da casca de soja.

Outra característica importante que diferencia a casca de soja de outros resíduos lignocelulósicos é o seu alto teor de proteínas (Tabela 8). Essas proteínas podem ser recuperadas por hidrólise proteolítica como uma mistura de oligopeptídeos de alto valor comercial, aplicados na indústria farmacêutica e de alimentos (ROJAS et al., 2014).

Na Tabela 9 é apresentada a granulometria da casca de soja *in natura* utilizada neste trabalho. Observa-se que a maior parte das partículas (aproximadamente 79%) possuem granulometria menor que 10 mesh, o que equivale a 2,00 mm, que são caracterizados com pós e sólidos granulares, descartando-se assim a necessidade da etapa de moagem da biomassa, necessária para melhorar a eficiência nos pré-tratamentos e em hidrólises enzimáticas. Sendo assim, a casca de soja proporciona uma economia energética de processo, uma vez que a etapa de moagem para a redução do tamanho das partículas da biomassa pode acarretar alto consumo de energia (TALEBNIA; KARAKASHEV; ANGELIDAKI, 2010).

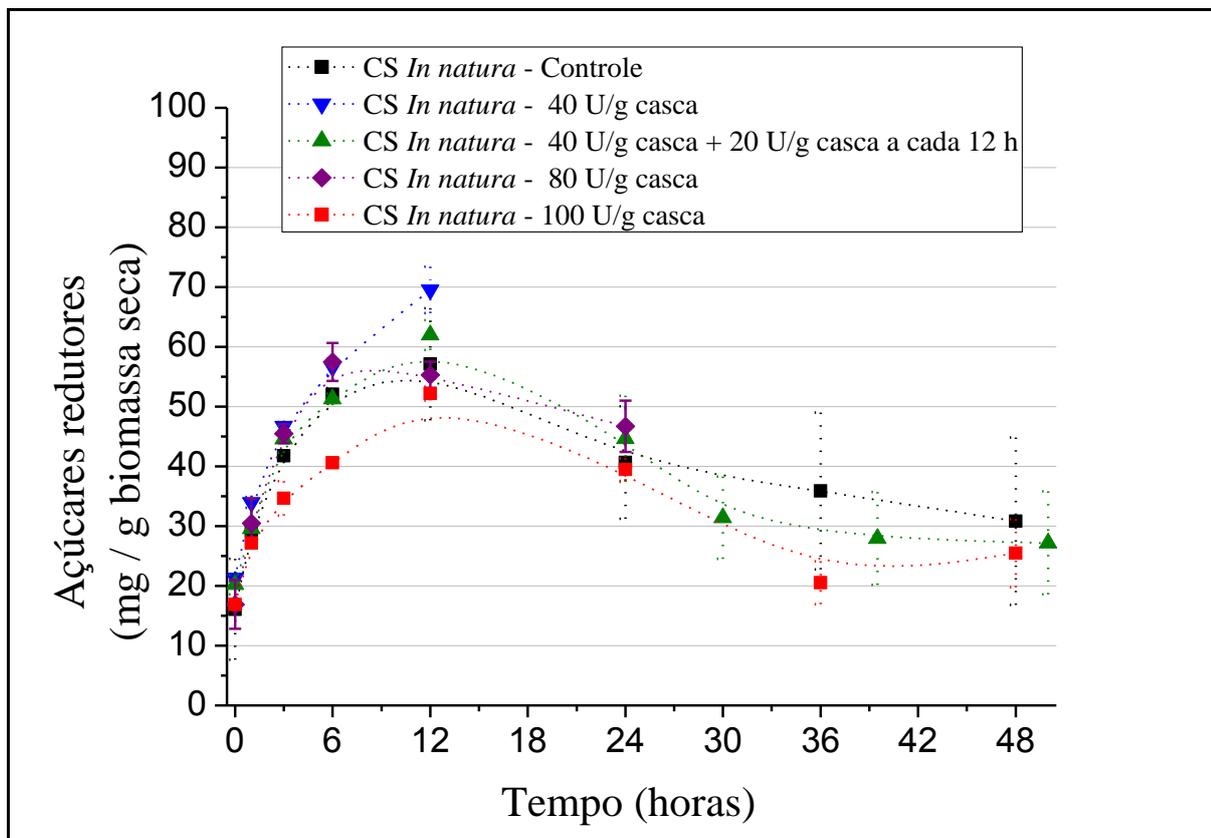
Tabela 9 – Granulometria da casca de soja *in natura*.

Tipo de sólido	Tamanho	Granulometria	
		Massa (g)	%
Sólido granular	>10 mesh (2,00 mm)	56,0	20,9
	>20 mesh (0,84 mm)	121,9	45,5
Pó	>42 mesh (0,35 mm)	58,5	21,8
	>80 mesh (0,18 mm)	25,1	9,4
	<80 mesh (0,18 mm)	6,2	2,3
Total		267,6	100

4.3. Hidrólise enzimática de casca de soja *in natura*

Hidrólises enzimáticas catalisadas por endoxilanase recombinante de *B. subtilis* foram realizadas em reator com aquecimento convencional usando casca de soja *in natura* como substrato, a fim de se avaliar o efeito da carga enzimática na hidrólise da fração hemicelulósica da biomassa. As reações foram iniciadas pela adição de cargas enzimáticas de 40, 80 e 100 U/g de casca de soja. Os resultados de açúcares redutores (AR) em função do tempo são mostrados na Figura 17.

Figura 17 - Perfis de açúcares redutores (AR) em função do tempo a 45°C, pH 5,5, para casca de soja (CS) *in natura* (1:11, m/v), hidrolisada com endoxilanase recombinante de *B. subtilis*.



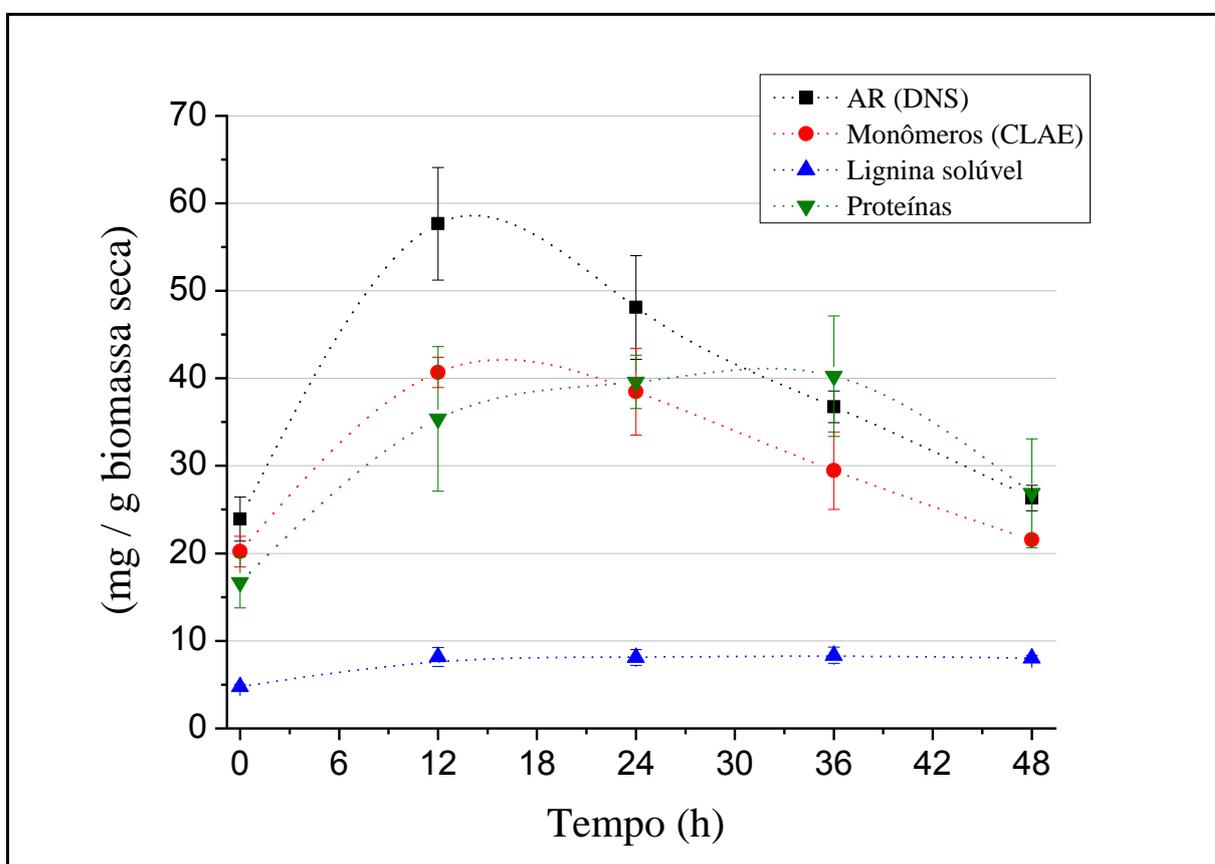
Pode-se observar que os perfis de formação de AR em função do tempo com as cargas enzimáticas avaliadas são todos semelhantes ao controle (ensaio sem adição de enzima). A fim de se verificar se havia inativação da enzima durante os ensaios, o reator foi alimentado inicialmente com 40 U/g de casca, sendo realimentado a cada 12 h de reação com 20 U/g de casca. Nenhum incremento na formação de AR foi observado.

Os resultados sugerem uma alta recalcitrância da biomassa lignocelulósica à ação enzimática, comprovando a necessidade de um pré-tratamento adequado para disponibilizar a fração C5 para a ação da endoxilanase. Além disso, observou-se uma redução na concentração de AR após 12 h de reação, fenômeno esse que poderia estar associado à contaminação no meio reacional, por apresentar carboidratos solúveis, e/ou reação de Maillard, reação que é favorecida em condições de umidade moderada e alta temperatura (79% e 60°C, respectivamente, que são condições ótimas para a reação de Maillard), gerando um conjugado proteína-polissacarídeo de cor marrom que ocorre devida à interação do grupo redutor do polissacarídeo (carbonila) com o grupo α -amino terminal de peptídeos e ϵ -amino de lisina presente nas proteínas solubilizadas (LAROQUE et al., 2008; SESSA; WOLF, 2001). De fato,

ROJAS et al. (2014) reportam que em torno de 36% das proteínas presentes na casca de soja *in natura* são solubilizadas pela incubação da biomassa em pH 5,6 por 30 min.

O ensaio controle (sem adição de enzima) da casca de soja *in natura* foi também monitorado medindo-se AR por DNS, carboidratos e ácidos orgânicos totais (monômeros de glicose, xilose, arabinose, ácido acético, etc.) das amostras líquidas por CLAE (antes e após hidrólise ácida das amostras conforme a metodologia em 3.2.8), lignina solúvel por espectrometria a 280 nm e proteínas totais por Kjeldahl, como demonstra o gráfico na Figura 18.

Figura 18 – Perfis dos compostos solubilizados a 45°C, pH 5,5, para casca de soja (CS) *in natura* (1:11, m/v), em ensaio controle (s/ enzima).



Pode-se observar na Figura 18 que o perfil de AR é similar ao perfil de monômeros, destoando levemente quanto as concentrações, que se encontram maiores para leitura realizada com DNS, fato este devido a presença de oligo e polissacarídeos que apresentam maior reatividade com o DNS e conseqüentemente maior fator de resposta (JEFFRIES; YANG; DAVIS, 1998), a pesar disto nos dois perfis se observa queda na concentração após 12 h de reação. Portanto, pode-se concluir que esta queda não se deve a

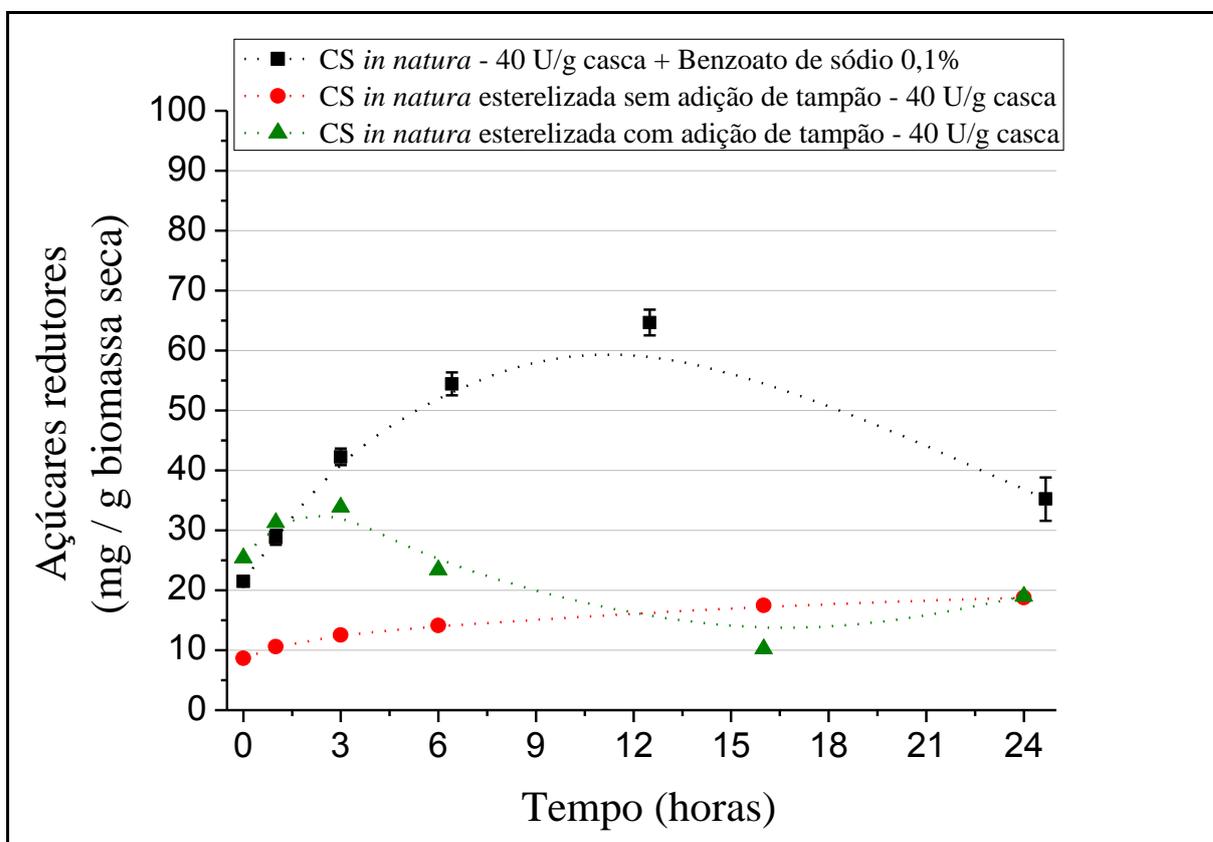
interferência no método do DNS, podendo este ser utilizado para monitorar a solubilização de carboidratos.

Outro fato que pode-se observar é a solubilização de uma quantidade considerável de proteínas (medida por N total), seguido de uma queda nas concentrações de proteínas e de monômeros, podendo indicar uma readsorção na fração sólida de oligômeros e proteínas ou os conjugados proteína-polissacarídeo formados na reação de Maillard. Entretanto, este fenômeno deve ser melhor investigado.

A fim de verificar se a redução de AR devia-se a contaminação por microrganismos endofíticos presentes na casca de soja (IKEDA et al., 2010) ou contaminantes do ambiente, realizaram-se hidrólises com endoxilanase utilizando casca de soja *in natura* esterilizada em autoclave (uma amostra de biomassa seca e uma amostra de biomassa em presença de tampão citrato 50 mM, pH 5,5 a 121°C por 30 min) e hidrólises na presença de benzoato de sódio (conservante bactericida e fungicida, utilizado na indústria alimentícia) na concentração de 0,1% (m/v).

A Figura 19 mostra os perfis obtidos da hidrolise enzimática destas três biomassas utilizadas.

Figura 19 – Perfis de açúcares redutores em função do tempo a 45°C, pH 5,5 (tampão citrato de sódio 50 mM) para casca de soja (CS) *in natura* esterilizada e casca de soja *in natura* na presença de benzoato de sódio hidrolisadas com endoxilanas recombinante de *B. subtilis*.



Pode-se observar que a hidrólise da casca de soja em presença de benzoato de sódio não evitou a redução na concentração de AR após 12 h de reação, atingindo uma máxima concentração de açúcares similar à hidrólise sem o conservante (aproximadamente 65 mg de AR/g de biomassa seca). Já as hidrólises de casca de soja esterilizada foram muito ineficientes, liberando no máximo 35 mg de AR/g de biomassa seca. Nesse caso, a esterilização pode ter aumentado a recalcitrância da biomassa lignocelulósica, dificultando o acesso da endoxilanas à fração de xilana.

De modo geral, esses ensaios mostraram que a redução da concentração de açúcares no meio reacional não se devia à contaminação microbiana, permitido reforçar a hipótese de que em meio ácido (pH 5,5) e na presença de proteínas e carboidratos solubilizados da casca de soja, pode ter ocorrido reação de Maillard. De fato, LAROQUE et al. (2008) mostraram que a 55°C e pH 6,5 as pentoses (principalmente xilose) reagem com hidrolisado proteico (principalmente peptídeos) formando um complexo de coloração marrom, característico da reação de Maillard. Portanto, devido ao alto conteúdo de proteínas da casca de

soja (13,2%, Tabela 7), decidiu-se realizar uma hidrólise proteolítica da casca de soja como um pré-tratamento prévio à hidrólise com endoxilanase.

4.4. Pré-tratamento proteolítico da casca de soja e hidrólise com endoxilanase

Casca de soja *in natura* foi hidrolisada com a endoprotease Novo ProD[®] (1%, m/m) a 60°C e pH 9,0 conforme metodologia de ROJAS et al. (2014). A biomassa lignocelulósica desproteinizada foi submetida à hidrólise com endoxilanase a 45°C e pH 5,5 (tampão citrato de sódio 50 mM). A Tabela 10 mostra as composições químicas da casca de soja *in natura* e após pré-tratamento proteolítico, bem como o rendimento mássico do pré-tratamento. As composições dos componentes da casca de soja são expressas em relação à massa seca de casca de soja *in natura*.

Tabela 10 – Composições químicas percentuais (base massa seca) de casca de soja (CS) *in natura* e pré-tratada com endoprotease Novo Pro-D[®].

Amostra	η	%Celulose	%Hemicelulose	%Lignina	%Proteínas
CS <i>in natura</i>	1,00	34,65 ± 0,6	19,78 ± 0,3	11,51 ± 1,1	13,23 ± 0,7
CS pré-tratada (fração sólida)	0,75*	29,92 ± 1,4	18,01 ± 0,5	11,23 ± 0,6	5,09 ± 0,2
Fração líquida da hidrólise proteolítica		4,22 ± 0,1	5,86 ± 0,1	2,05 ± 0,1	9,57 ± 0,6

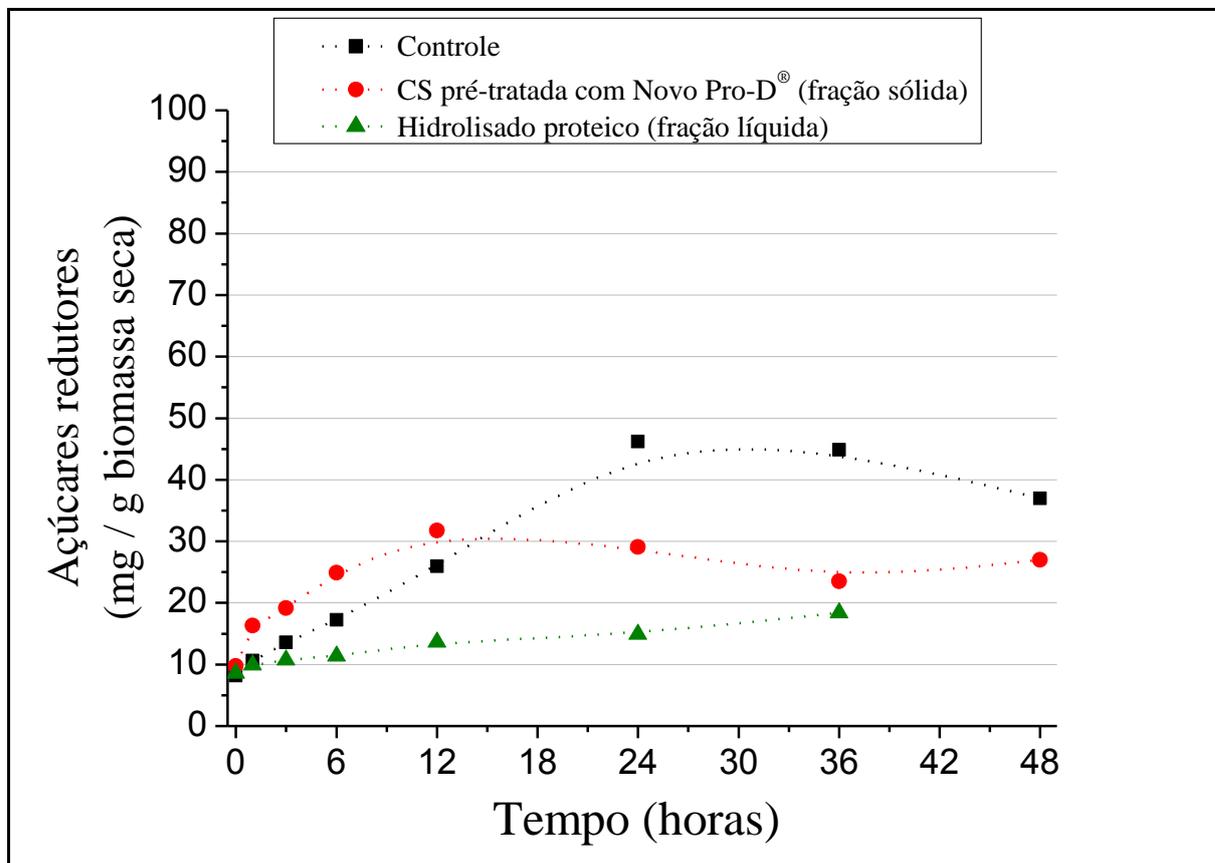
Os desvios padrões correspondem a resultados em triplicata das caracterizações do material sólido.

*Os rendimentos mássicos foram expressos em relação à massa seca de CS *in natura*.

Pode-se observar que o pré-tratamento proteolítico removeu aproximadamente 61% das proteínas presentes inicialmente na casca de soja, com baixa solubilização de celulose (14%) e hemicelulose (9%), conforme já reportado por ROJAS et al. (2014). As cadeias de celulose possuem regiões cristalinas e amorfas, sendo regiões amorfas mais susceptíveis à degradação (FENGEL; WEGENER, 1983). Já a hemicelulose é um heteropolissacarídeo amorfo, mais facilmente hidrolisado (TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

A redução de proteínas na biomassa sólida não evitou a redução de AR no meio reacional de hidrólise com endoxilanase, como mostra a Figura 20. Além disso, a máxima concentração de AR foi duas vezes menor àquela obtida na hidrólise da casca de soja *in natura*.

Figura 20 – Perfis de açúcares redutores em função do tempo a 45°C, pH 5,5 (tampão citrato de sódio 50 mM) de casca de soja pré-tratada com endoprotease Novo Pro-D® (frações sólida e líquida) hidrolisadas com endoxilanase recombinante de *B. subtilis* (7,3 U/mL).



A Figura 20 mostra também que na hidrólise da hemicelulose solúvel (fração líquida do hidrolisado com Novo Pro-D®) não houve redução de AR, pelo menos durante o período de tempo ensaiado. Esperava-se que este substrato seria muito mais propício à reação de Maillard, devido ao alto conteúdo de proteínas solubilizadas. Entretanto, a concentração de AR foi baixa (menos de 20 mg de AR/g de biomassa seca), assim como a concentração de AR obtida na hidrólise da casca de soja esterilizada a seco (Figura 19), onde também não se observou redução de AR. Estes resultados indicam que se ocorrem realmente reações de Maillard, estas necessitam de uma concentração mínima de açúcares redutores. De fato, é reportado que vários parâmetros influenciam na ocorrência de reação de Maillard, tais como, natureza, concentração e proporção dos reagentes (compostos contendo grupos aminos e carbonilas), atividade de água, tempo de aquecimento, pH, concentração e tipo de tampão, presença de oxigênio, luz ou íons metálicos (LAROQUE et al.; 2008).

O pré-tratamento proteolítico, embora permita a recuperação de proteínas de soja com alto valor agregado (SUN, 2011), não permitiu a redução da recalcitrância da biomassa lignocelulósica, de forma a facilitar a ação da endoxilanase sobre a hemicelulose, já que a ação enzimática da endoprotease não remove lignina (ver Tabela 10). Portanto, pré-tratamentos termoquímicos mais eficazes são necessários para disponibilizar a fração hemicelulósica à ação da endoxilanase, sem a formação significativa de seus monômeros (xilose, por exemplo) e produtos de degradação.

4.5. Pré-tratamento com peróxido de hidrogênio/ácido acético (H₂O₂/HAc)

A presença de lignina na biomassa lignocelulósica dificulta a acessibilidade das enzimas às frações de hemicelulose e celulose (TAHERZADEH; KARIMI, 2008). Dentre os pré-tratamentos reportados para a remoção de lignina, o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio e ácido acético (H₂O₂/HAc) tem mostrado bons resultados para o bagaço de cana-de-açúcar. O uso de H₂O₂/HAc é muito efetivo na quebra dos anéis aromáticos presentes na lignina (BRAGATTO et al., 2013).

Para avaliar a ação do pré-tratamento sobre a CS *in natura* com H₂O₂/HAc, realizou-se ensaios em shaker variando o tempo de reação (1, 3, 6 e 9 h), usando as concentrações de H₂O₂ e ácido acético de 2,16 M e 8,74 M, respectivamente, temperatura de 60°C e agitação de 300 rpm. Os resultados das caracterizações da biomassa pré-tratada (CS/H₂O₂/HAc) em função do tempo de pré-tratamento são mostrados na Tabela 11.

Tabela 11 - Composições químicas percentuais da fração sólida da casca de soja (CS) *in natura* e pré-tratada com peróxido de hidrogênio e ácido acético (CS/H₂O₂/HAc).

Amostra	η	%Celulose	%Hemicelulose	%Lignina	%Proteínas
CS <i>in natura</i>	1,00	34,65 ± 0,6	19,78 ± 0,3	11,51 ± 1,1	13,23 ± 0,7
CS/H ₂ O ₂ /HAc (1h)	0,79*	26,11 ± 1,1	11,79 ± 1,0	9,18 ± 0,3	8,28 ± 0,4
CS/H ₂ O ₂ /HAc (3h)	0,78*	27,94 ± 0,3	12,26 ± 0,1	9,19 ± 0,2	7,04 ± 0,4
CS/H ₂ O ₂ /HAc (6h)	0,75*	25,84 ± 4,5	7,53 ± 1,3	8,56 ± 0,4	5,92 ± 0,1
CS/H ₂ O ₂ /HAc (9h)	0,71*	26,18 ± 0,2	7,63 ± 0,1	9,22 ± 0,5	4,82 ± 0,1

Os desvios padrões correspondem a resultados em triplicata das caracterizações do material sólido.

*Os rendimentos mássicos foram expressos em relação à massa seca de CS *in natura*.

O pré-tratamento com H₂O₂/HAc removeu em média 20% de lignina, sendo que o tempo de pré-tratamento não influenciou significativamente na sua remoção, pelo menos no intervalo de tempo avaliado. TAN et al. (2010), utilizando o bagaço de cana-de-açúcar, reportaram resultado similar (20% de remoção de lignina após 3 h) para o pré-tratamento da biomassa com H₂O₂/HAc.

A solubilização de hemicelulose e proteínas foi influenciada pelo tempo de reação, variando de 40% (1h) para 61% (9h) para a hemicelulose e de 37% (1h) para 64% (9h) para as proteínas. Celulose apresentou uma perda de aproximadamente 23%.

Como o tempo de pré-tratamento não influenciou na remoção de lignina e quanto menor o intervalo de tempo do tratamento, menores quantidades de hemicelulose eram removidas, adotou-se neste trabalho o menor tempo (1 h) de pré-tratamento para a casca de soja com H₂O₂/HAc.

Fixando o tempo de pré-tratamento em 1 h, investigou-se a influência da concentração molar de peróxido e ácido acético no pré-tratamento da casca de soja pré-tratada com endoprotease Novo Pro-D[®], ou seja, com menores concentrações de proteínas. As concentrações de H₂O₂/HAc avaliadas foram (4,18M:1,46M), (4,55M:0,79M), (5M:0) e (10M:0). Os resultados das caracterizações químicas das biomassas pré-tratadas são mostrados na Tabela 12.

Tabela 12 – Composições químicas percentuais de casca de soja (CS) *in natura* e pré-tratada com endoprotease seguido por H₂O₂/HAc.

Amostra	η	%Celulose	%Hemicelulose	%Lignina	%Proteínas
CS <i>in natura</i>	1,00	34,65 ± 0,6	19,78 ± 0,3	11,51 ± 1,1	13,23 ± 0,7
CS desproteïnizada	0,75*	29,92 ± 1,4	18,01 ± 0,5	11,23 ± 0,6	5,09 ± 0,2
H ₂ O ₂ /HAc (4,18M:1,46M)	0,70*	31,65 ± 0,6	19,06 ± 0,1	7,08 ± 0,9	3,83 ± 0,4
H ₂ O ₂ /HAc (4,55M:0,79M)	0,68*	28,16 ± 0,2	16,60 ± 0,1	6,30 ± 0,5	3,52 ± 0,2
H ₂ O ₂ /HAc (5M:0)	0,70*	29,74 ± 0,2	17,69 ± 0,3	5,09 ± 0,3	3,50 ± 0,1
H ₂ O ₂ /HAc (10M:0)	0,63*	28,25 ± 0,2	10,30 ± 0,1	7,55 ± 0,2	1,59 ± 0,1

Os desvios padrões correspondem a resultados em triplicata das caracterizações do material sólido.

*Os rendimentos mássicos foram expressos em relação à massa seca de CS *in natura*.

Observa-se na Tabela 12 que usando somente peróxido de hidrogênio a 5 M foi possível a remoção de aproximadamente 56% de lignina. Entretanto, observou-se também 14% e 11% de solubilização de celulose e hemicelulose, respectivamente. BRAGATTO et al. (2013) reportaram para o pré-tratamento do bagaço de cana com peróxido/ácido acético remoções de 92,3%, 18,3% e 5% de lignina, hemicelulose e celulose, respectivamente. Os autores reportam que perda de hemicelulose é inevitável devido às interações covalentes e não covalentes hemicelulose-lignina. Neste trabalho, o uso de ácido acético na deslignificação da casca de soja não mostrou efeito significativo na remoção de lignina ou hemicelulose.

As biomassas pré-tratadas com H₂O₂ nas concentrações de 5M e 10M foram selecionadas para avaliar a ação da endoxilanase sobre a fração hemicelulósica da fração sólida (previamente lavada abundantemente com água destilada até neutralização). Embora a concentração de peróxido de 10 M tenha resultado em maior perda de hemicelulose, proporcionou maior remoção de proteínas, apresentando uma concentração de menos de 2% (base seca) na biomassa pré-tratada.

A seguir são apresentadas a Figura 21, que mostra os balanços de massa dos principais constituintes da casca de soja para os processos integrados (pré-tratamentos sequenciais com endoprotease, H₂O₂ e hidrólise com endoxilanase) em forma de fluxograma para melhor compreensão do processo estudado, e a Figura 22, que apresenta os perfis de açúcares redutores em função do tempo nas hidrólises das biomassas com endoxilanase recombinante de *B. subtilis*.

Figura 21 – Balanço de massa para os principais componentes da casca de soja para o processo sequencial de hidrólise proteolítica, pré-tratamento com peróxido de hidrogênio e hidrólise com endoxilanase.

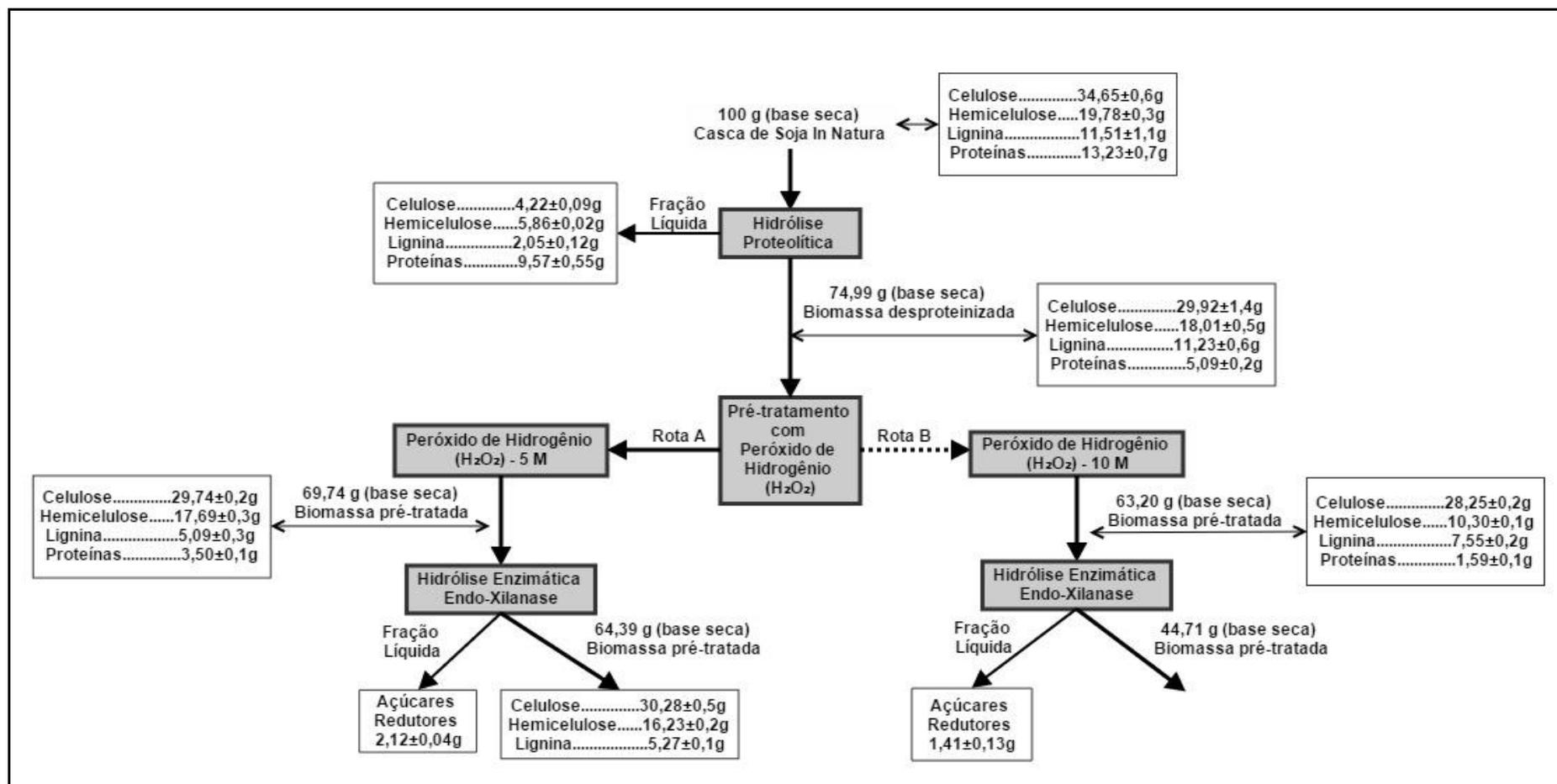
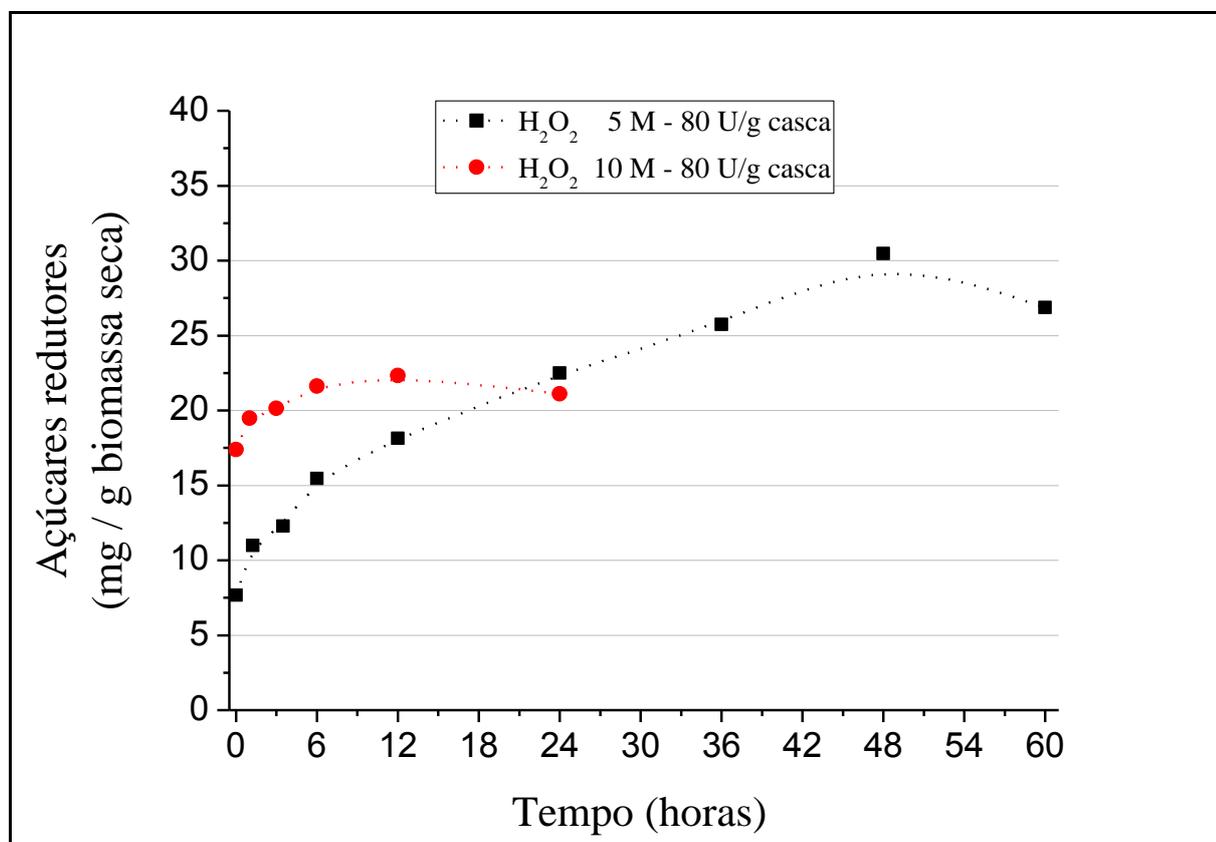


Figura 22 – Perfis de açúcares redutores em função de tempo de hidrólise com endoxilanase da casca de soja pré-tratada sequencialmente com endoprotease Novo Pro-D® e peróxido de hidrogênio (5 e 10 M). Condições de hidrólise: 45°C, pH 5,5 (tampão citrato de sódio 50 mM) e 80 U/g de casca.



A hidrólise com endoxilanase da casca de soja desproteïnizada e pré-tratada com peróxido 5 M rendeu 30,5 mg de AR/ g de biomassa seca no tempo de 48 h e a hidrólise com a casca de soja pré-tratada com 10 M de peróxido de hidrogênio rendeu 22,3 mg de AR/ g de biomassa seca (casca de soja pré-tratada). Deve-se notar que a quantidade de hemicelulose na biomassa pré-tratada com H₂O₂ 5 M é maior que na pré-tratada com peróxido 10 M. Estes resultados mostraram que o pré-tratamento com peróxido de hidrogênio não foi eficiente na disponibilização da hemicelulose de casca de soja à ação de endoxilanase; já BRAGATTO et al. (2013) reportaram uma produção de XOS em torno de 120 mg de AR/g biomassa seca pela hidrólise com endoxilanase recombinante de *B. subtilis* utilizando o bagaço de cana-de-açúcar deslignificado com peróxido/ácido acético.

Pode-se observar a partir das Figuras 21 e 22 que apesar da biomassa apresentar baixas concentrações de lignina e proteína ainda persiste uma barreira para a ação enzimática sobre hemicelulose presente na fração sólida de casca de soja. Surge como alternativa para superar esta barreira e melhorar a hidrólise enzimática, a utilização de um

diferente pré-tratamento para realizar a solubilização da hemicelulose da casca de soja para fração líquida.

4.6. Pré-tratamento organossolve-etanol

O pré-tratamento organossolve é um processo no qual ocorre simultaneamente a hidrólise da hemicelulose (hidrólise das ligações glicosídicas) catalisada pela água a alta temperatura (formação de íon hidroxônio, que ataca as ramificações acetila, liberando ácido acético) e a solubilização da lignina na presença de um co-solvente orgânico (etanol ou metanol), resultado da hidrólise de ligações éter (α -O-4 e β -O-4) da macromolécula de lignina (SUN; CHENG, 2002; TAHERZADEH; KARIMI, 2008).

Como a ação da endoxilanase nos sólidos pré-tratados anteriormente não foi satisfatória, investigou-se a influência do pré-tratamento organossolve-etanol na solubilização da hemicelulose como xilana e xilo-oligômeros, visando à produção de XOS pela ação da endoxilanase nas frações líquida e sólida resultantes deste pré-tratamento. Sendo assim, a casca de soja desproteïnizada (pré-tratada com endoprotease Novo Pro-D[®]) foi submetida ao pré-tratamento organossolve-etanol (50%, v/v) a 170°C por 60 min. As frações líquida e sólida foram submetidas à hidrólise com endoxilanase recombinante de *B. subtilis*.

A Tabela 13 mostra os resultados obtidos da caracterização da fração sólida da casca de soja a cada etapa de pré-tratamento da casca desproteïnizada e após hidrólise enzimática.

Tabela 13 – Composições químicas percentuais de casca de soja (CS) *in natura* e pré-tratada com endoprotease, seguido por organossolve 50% EtOH e hidrólise enzimática.

Amostra	η	%Celulose	%Hemicelulose	%Lignina	%Proteínas
CS <i>in natura</i>	1,00	34,65 ± 0,6	19,78 ± 0,3	11,51 ± 1,1	13,23 ± 0,7
CS desproteinizada	0,75*	29,92 ± 1,4	18,01 ± 0,5	11,23 ± 0,6	5,09 ± 0,2
FS Organossolve-EtOH 50%	0,54*	33,47 ± 1,7	15,02 ± 0,7	5,65 ± 0,4	-
FS Organossolve-EtOH 50% + Hidrólise enzimática	0,52*	30,90 ± 0,1	13,03 ± 0,3	4,67 ± 0,5	-

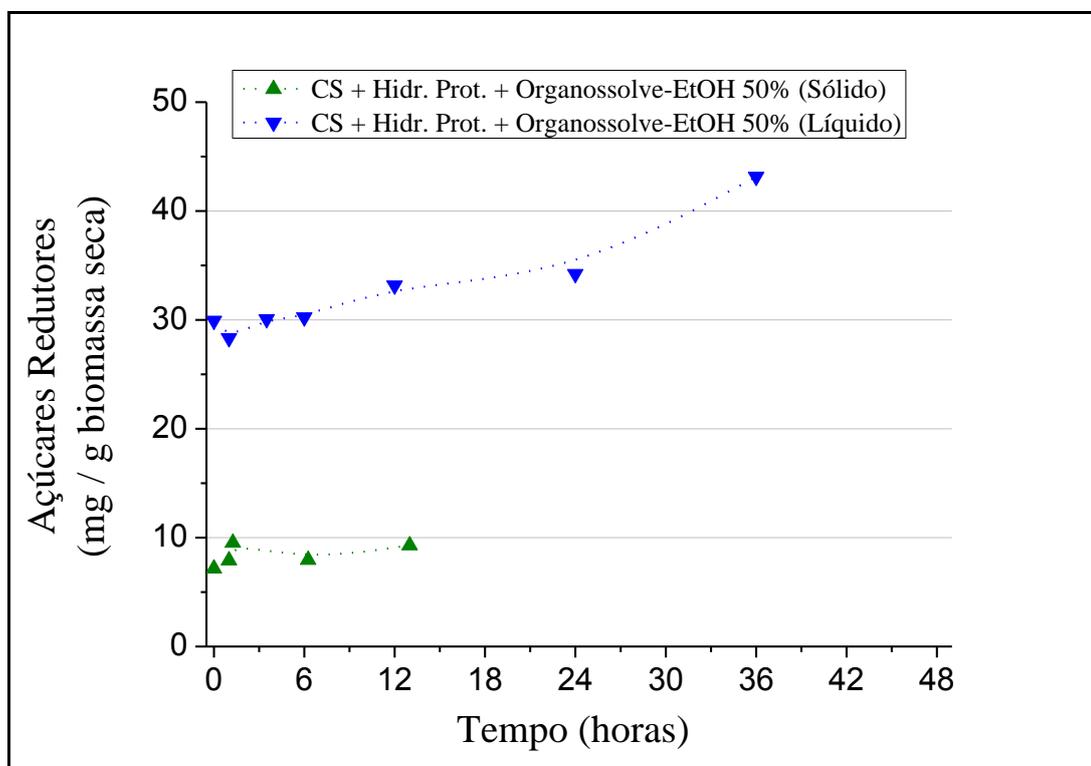
Os desvios padrões correspondem a resultados em triplicata das caracterizações do material sólido.

*Os rendimentos mássicos foram expressos em relação à massa seca de CS *in natura*.

FS, fração sólida.

Pode-se observar na Tabela 13 que o pré-tratamento organossolve EtOH 50% a 170°C por 60 min sobre a casca de soja desproteinizada apresentou remoção em torno de 50% de lignina e uma solubilização de 16% da hemicelulose e sem remoção da celulose, como observado por WILDSCHUT et al. (2013) com a palha de trigo realizando o pré-tratamento organossolve EtOH 50% a 190°C por 60 min, que removeu 39% de lignina, 36% de hemicelulose e também sem remoção de celulose. A caracterização química da fração sólida da casca de soja após a hidrólise com a endoxilanase apresentou resultado semelhante aos obtidos anteriormente com a casca de soja *in natura* e após pré-tratamento com endoprotease e seguido por pré-tratamento com peróxido de hidrogênio e ácido acético. Todas as biomassas mostraram baixa hidrólise da hemicelulose e, conseqüentemente, baixa produção de açúcares redutores, como observado na Figura 23. Nesta figura, o perfil de AR em função do tempo mostra uma concentração máxima de 9,5 mg de AR/ g de biomassa seca após 1 h de reação com a fração sólida.

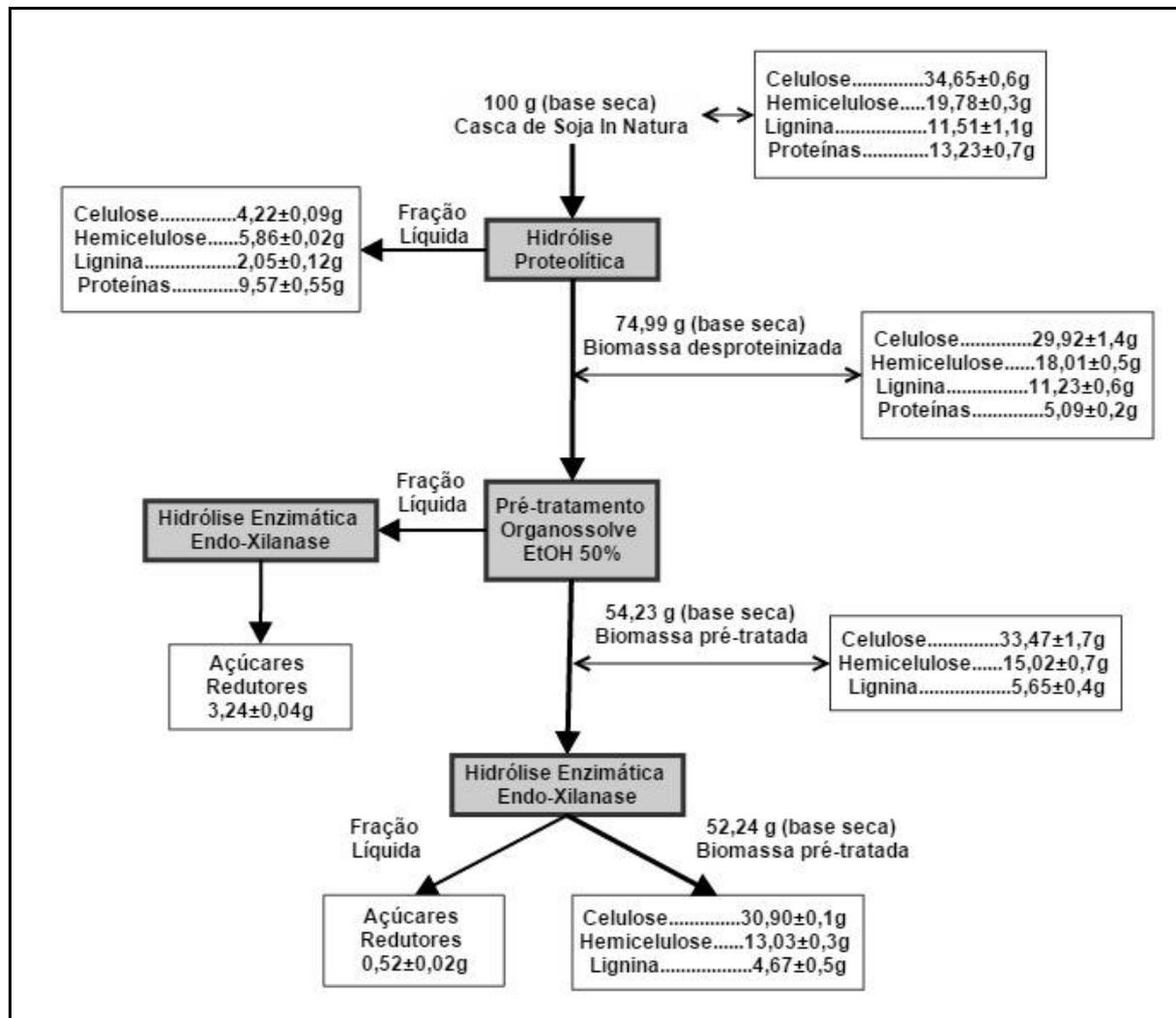
Figura 23 – Perfis de açúcares redutores em função do tempo na hidrólise com endoxilanase (45°C, pH 5,5) de casca de soja pré-tratada (proteólise seguido de organossolve 50% EtOH) frações sólidas e líquidas.



Pode-se também na Figura 23 que na hidrólise da fração líquida com endoxilanase obteve-se um perfil com baixas concentrações de AR no meio reacional, 43,1 mg AR/g de biomassa seca, justificado pela baixa concentração de hemicelulose solubilizada no pré-tratamento organossolve-etanol 50% da casca desproteïnizada.

A Figura 24 apresenta resumidamente os balanços de massa dos principais constituintes da casca de soja para os processos integrados (pré-tratamentos sequenciais com endoprotease seguido de organossolve-etanol 50% e hidrólise com endoxilanase).

Figura 24 - Balanço de massa para os principais componentes da casca de soja para o processo sequencial de hidrólise proteolítica, pré-tratamento organossolve-etanol 50% (v/v) e hidrólise com endoxilanas.



Observa-se que os pré-tratamentos sequenciais hidrólise proteolítica/organossolve solubilizaram em torno de 24% de hemicelulose, sendo que a hidrólise proteolítica foi responsável por 9% dessa solubilização.

A fim de se evitar perdas de hemicelulose, solubilizada na etapa de hidrólise proteolítica, a casca de soja *in natura*, sem nenhum tipo de tratamento, foi então pré-tratada por organossolve-etanol utilizando concentrações de 50 e 70% etanol-água (v/v). Os resultados da caracterização das frações sólida e líquida destes pré-tratamentos são mostrados na Tabela 14.

Tabela 14 – Composições químicas percentuais de casca de soja (CS) *in natura* e pré-tratada por organossolve-etanol nas concentrações de 50 e 70% EtOH, frações sólida e líquida.

Amostra	η	%Celulose	%Hemicelulose	%Lignina	%Proteínas
CS <i>in natura</i>	1,00	34,65 ± 0,6	19,78 ± 0,3	11,51 ± 1,1	13,23 ± 0,7
FS Organossolve-EtOH 50%	0,62*	33,79 ± 0,6	13,63 ± 0,2	7,44 ± 0,2	2,65 ± 0,2
FL Organossolve-EtOH 50%	-	1,61	4,47	2,46	-
FS Organossolve-EtOH 70%	0,63*	34,35 ± 0,7	14,19 ± 0,1	7,49 ± 0,2	2,93 ± 1,5
FL Organossolve-EtOH 70%	-	1,10	3,44	2,23	-

Os desvios padrões correspondem a resultados em triplicata das caracterizações do material sólido.

*Os rendimentos mássicos foram expressos em relação à massa seca de CS *in natura*.

FS, fração sólida; FL, fração líquida.

A Tabela 14 mostra que os pré-tratamentos organossolve-etanol 50 e 70% (v/v) apresentaram rendimento mássico semelhante ($\eta \sim 0,62$), assim como composições químicas similares em termos de celulose, hemicelulose, lignina e proteínas nas frações sólidas remanescentes. Ambos pré-tratamentos solubilizaram em torno de 30% de hemicelulose, 35% de lignina, 2% de celulose e 79% de proteínas. WILDSCHUT et al. (2013) utilizando a palha de trigo realizou o pré-tratamento com organossolve-etanol na concentração de 60% etanol a 190°C durante o tempo de 60 minutos, alcançando remoção em torno de 30% xilose, 37,7% de lignina e 2,8% de glicose, valores próximos aos obtidos neste trabalho utilizando-se a casca de soja.

A Tabela 15 mostra os rendimentos de extração de hemicelulose para a fração sólida e líquida e o rendimento de extração para hemicelulose na forma oligomérica e monomérica.

Tabela 15 – Comparação entre os rendimentos de extração de hemicelulose no sólido e o rendimento quantificado na fração líquida; e a distribuição da fração líquida em oligômeros e monômeros de hemicelulose.

Condições de pré-tratamento organossolve	Rendimento de remoção de hemicelulose no sólido	Rendimento de recuperação de hemicelulose no líquido	Rendimento de extração de hemicelulose em oligômeros	Rendimento de extração de hemicelulose em monômeros
50% etanol (v/v)	31,09 ± 0,9% (a1)	22,58% (déficit 8,51%)	19,47%	3,11%
70% etanol (v/v)	28,26 ± 0,6% (a2)	17,38% (déficit 10,88%)	15,55%	1,83%

Observa-se na Tabela 15 que o pré-tratamento utilizando EtOH na concentração de 50% foi mais eficiente na remoção da hemicelulose do sólido e apresentou maior recuperação da hemicelulose na fração líquida e com maior concentração de oligômeros de hemicelulose (xilose e arabinose na forma de oligossacarídeos). No organossolve com concentração de 70% EtOH, obteve-se o menor rendimento de extração da hemicelulose na forma de monômeros de xilose e arabinose, entretanto isto deve estar relacionado a menor concentração de hemicelulose hidrolisada.

Na Tabela 16 são mostrados a massa de xilo-oligômeros solubilizada nos pré-tratamentos e os rendimentos de extração da hemicelulose em xilo-oligômeros e xilose.

Tabela 16 – Massa de xilo-oligômeros e rendimentos de extração de xilo-oligômeros e xilose em relação à xilana solubilizados para as respectivas condições de pré-tratamento organossolve.

Condições de pré-tratamento organossolve	$M_{xilo-oligômeros}$	$R_{xilo-oligômeros}$	R_X
50% etanol (v/v)	1,63g/100g de casca	11,32%	3,29%
70% etanol (v/v)	0,97g/100g de casca	6,71%	2,28%

Pode-se notar que dos 19,47% da hemicelulose extraída para a fração líquida na forma de oligômeros, apenas 1,63 g de XOS foram produzidos para 100 g de casca pré-tratada com organossolve-etanol 50%. Em outras palavras, de toda xilose presente em 100 g

de casca de soja, 11,32% foi solubilizada na forma de XOS e 3,29% na forma monomérica de xilose, permanecendo na fração sólida 85% da xilose. O mesmo comportamento foi observado para a casca de soja pré-tratada com organossolve-etanol 70%.

Continuando o processo para obtenção de XOS, as frações sólida e líquida foram submetidas à hidrólise com endoxilanase recombinante de *B. subtilis*. Os resultados mostrados nas Figuras 25 e 26 são os perfis de açúcares redutores e o balanço de massa do processo, respectivamente.

Figura 25 – Perfis de açúcares redutores em função do tempo na hidrólise com endoxilanase (45°C, pH 5,5) de casca de soja pré-tratada com o processo organossolve-etanol nas concentrações de 50 e 70% EtOH (v/v).

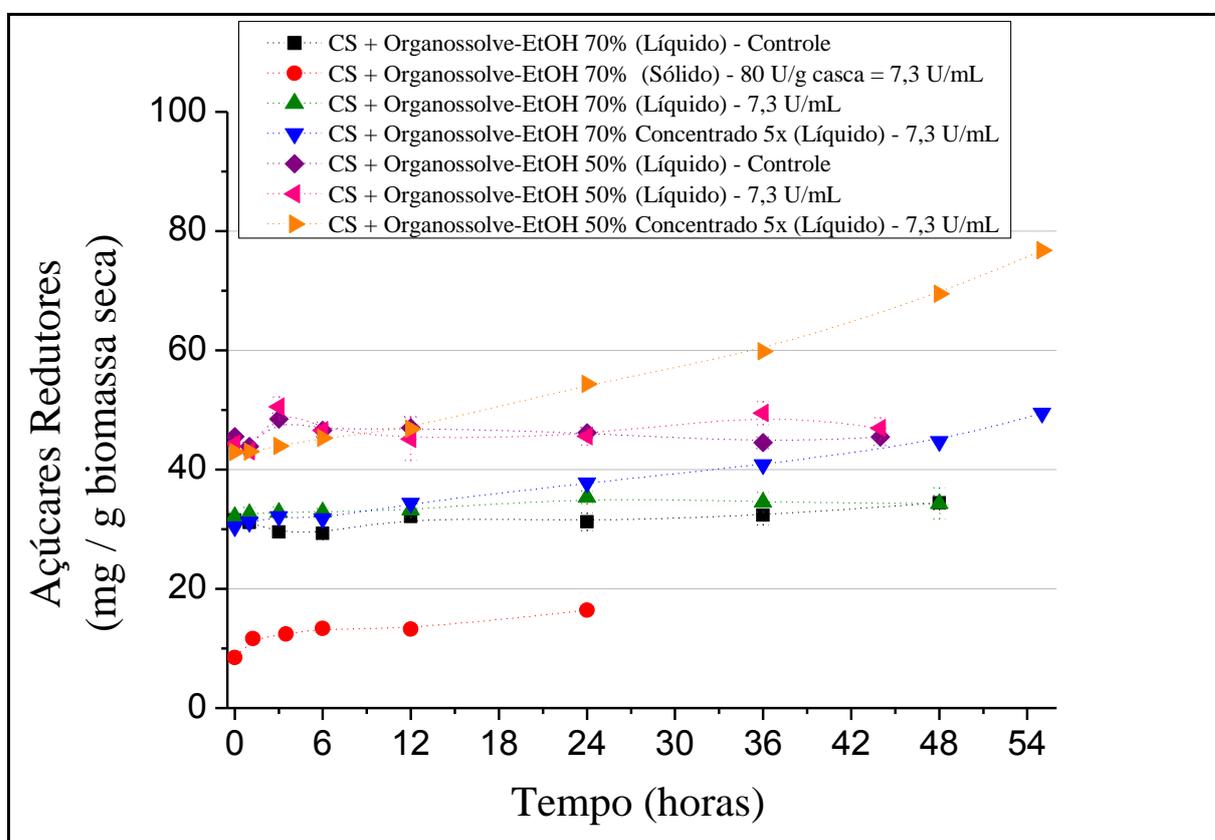
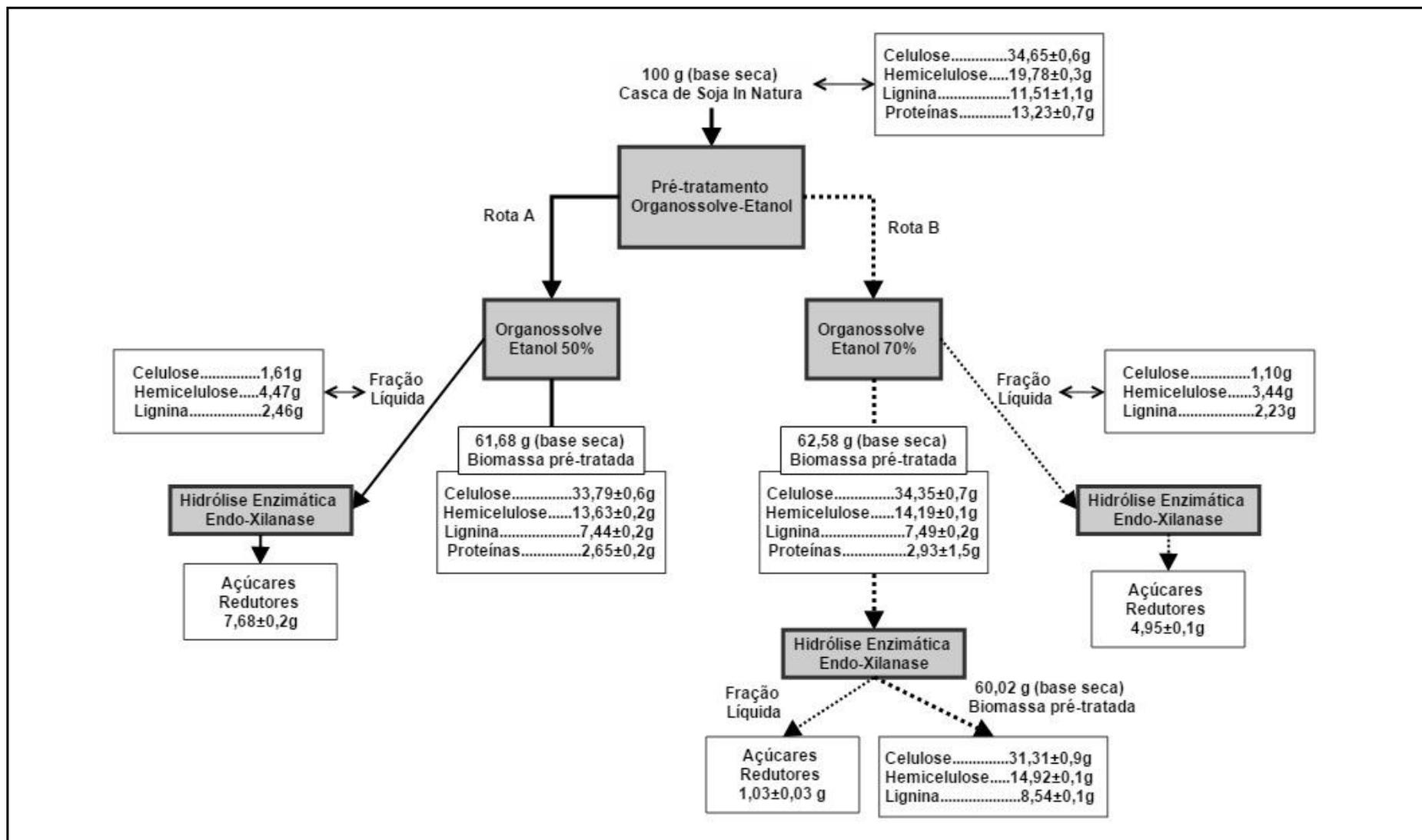


Figura 26 – Balanço de massa para os principais componentes da casca de soja *in natura* para o processo sequencial de pré-tratamento organossolve 50 e 70% (v/v) e hidrólise com endoxilanase.



A Figura 25 mostra que a hidrólise com endoxilanase da fração sólida do pré-tratamento organossolve-etanol 70% (v/v) rendeu apenas 16,4 mg de AR/g de biomassa seca, valor esse similarmente baixo aos apresentados anteriormente. Os perfis de AR para as hidrólises com endoxilanase das frações líquidas dos pré-tratamentos organossolve-etanol 50 e 70% (v/v) não apresentaram formação significativa de AR, mantendo o perfil observado no ensaio controle (sem enzima). A utilização das frações líquidas após uma concentração de 5 vezes, ou seja, uma concentração 5 vezes maior de oligômeros de hemicelulose, rendeu incrementos na concentração de AR, atingindo após 55 h de hidrólise valores de 76 e 49 mg AR/g biomassa seca, respectivamente para licores dos pré-tratamentos organossolve 50 e 70% (v/v). Entretanto, a maior concentração de AR obtida (76 mg AR/g biomassa seca) foi muito próxima à obtida a partir da hidrólise da casca de soja *in natura* (~65 mg AR/g biomassa seca), como mostra a Figura 13. Portanto, não se justifica um pré-tratamento dispendioso da casca de soja para a produção de XOS.

A Figura 26 mostra que os pré-tratamentos organossolve-etanol 50 e 70% (v/v) apresentaram uma baixa formação de AR das frações líquidas, podendo estar relacionado às altas concentrações de proteínas solubilizadas no pré-tratamento (79%), que podem reagir com os açúcares na reação Maillard, e a lignina que não precipitou no processo de rotaevaporação, permanecendo solúvel na fração líquida (~2,34 g/100 g de casca, base seca), e que poderia adsorver a endoxilanase, reduzindo a concentração de enzima ativa no meio reacional.

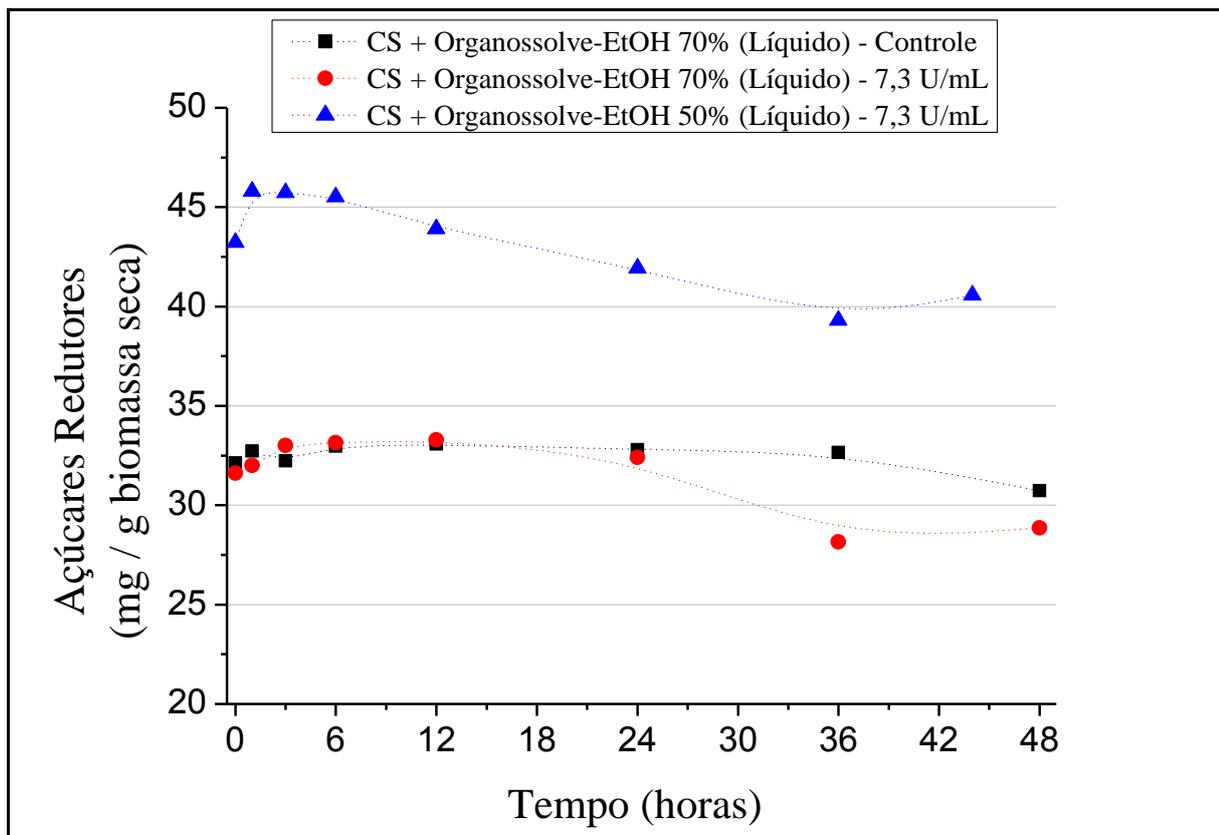
Conclui-se então que, com os baixos perfis de formação de AR para a fração sólida pré-tratada e para fração líquida, devido à baixa solubilização de hemicelulose e/ou a presença de compostos inibitórios na fração líquida, que o pré-tratamento organossolve-etanol nas condições estudadas não foi viável para otimizar a produção de XOS a partir da casca de soja, necessitando de outras abordagens para melhorar o processo enzimático.

4.7. Hidrólise de casca de soja *in natura* com endoxilanase em reator de micro-ondas

Hidrólises enzimáticas catalisadas com endoxilanase foram realizadas em reator com aquecimento induzido por micro-ondas em comparação ao reator de aquecimento convencional, a fim de se avaliar o efeito na eficiência enzimática gerado pela irradiação micro-ondas. Para estes testes realizou-se a hidrólise das frações líquidas geradas nos pré-tratamentos organossolve 50 e 70% (v/v). Os resultados de AR em função do tempo são

mostrados na Figura 27. Observa-se um aumento inicial na concentração de AR, atingindo rapidamente um valor máximo, a partir do qual se observa a redução na concentração de AR como anteriormente já relatado. O meio reacional irradiado por micro-ondas mostrou-se, supostamente, mais susceptível à formação de reação de Maillard.

Figura 27 – Perfis de açúcares redutores em função do tempo para a hidrólise com endoxilanase (45°C, pH 5,5) da fração líquida de casca de soja após pré-tratamento organossolve/etanol 50 e 70% (v/v) em reator de micro-ondas.

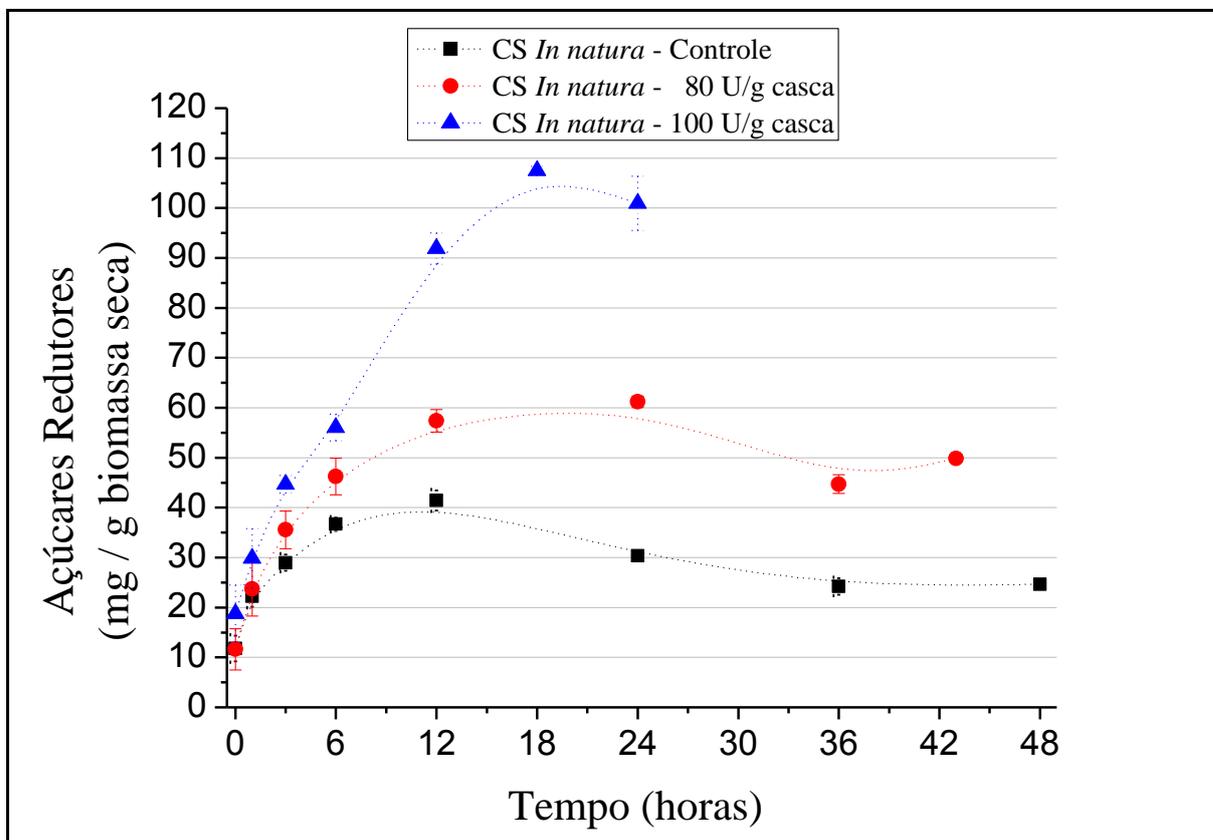


ZHU et al. (2006) avaliaram a hidrólise enzimática da casca de arroz com o meio reacional intermitentemente irradiado por micro-ondas. Os autores observaram que a atividade das celulases frente a carboximetilcelulose (atividade CMCase) e filtro de papel (atividade FPA) aumentaram sob a ação das micro-ondas, enquanto a atividade da celobiase sofreu uma redução. Entretanto, em ambos os casos, as micro-ondas afetaram apenas as velocidades iniciais da reação de hidrólise, permanecendo praticamente inalterado os rendimentos máximos em termos de açúcares redutores.

Casca de soja *in natura* foi também hidrolisada com endoxilanase utilizando-se cargas enzimáticas de 80 e 100 U/g de casca em reator com aquecimento induzido por micro-

ondas. Os resultados são apresentados na Figura 28.

Figura 28 – Perfis de açúcares redutores em função do tempo para a hidrólise com endoxilanase (45°C, pH 5,5) de casca de soja *in natura* em reator de micro-ondas.



Pode-se observar na Figura 28 que para a reação controle (sem adição de enzima) há uma formação máxima de 41,1 mg de AR/g casca, concentração menor em comparação à obtida na reação controle em reator convencional (57,1 mg de AR/g casca, Figura 17). Provavelmente essa diferença esteja associada as diferentes agitações promovidas pelos diferentes agitadores utilizados nesses dois tipos de reatores (Figuras 14 e 16-C).

Na reação catalisada com 80 U de endoxilanase/g de casca, a diferença de formação de AR entre os reatores convencional (Figura 17) e micro-ondas (Figura 28) foi pequena, formando um máximo de 57,5 mg de AR/g casca em reator convencional e 61,2 mg de AR/g casca em reator micro-ondas. Nesse caso, além da diferença nas agitações, poderia estar ocorrendo inativação da enzima de forma mais pronunciada no reator irradiado por micro-ondas. Entretanto, quando a carga enzimática foi aumentada para 100 U/g de casca, a liberação de AR no reator de micro-ondas atingiu 107,5 mg de AR/g de casca *in natura* (base seca) após 18 h de reação, enquanto a máxima liberação de AR no reator convencional era de 52,17 mg de

AR/g de casca após 12 h de reação (Figura 17), representando um incremento de aproximadamente 2 vezes na formação de AR. Comparado ao controle da reação em micro-ondas (reação não catalisada), obteve-se um incremento de cerca de 2,6 vezes na liberação de AR.

Embora o uso de micro-ondas em síntese orgânica e catálise química seja bem estabelecido devido ao fato da alta eficiência do aquecimento, podendo aumentar a velocidade da reação e reduzir o tempo reacional, o seu uso em hidrólise enzimática de materiais lignocelulósicos ainda é pouco reportado (ZHU et al., 2006). A irradiação micro-ondas ou a combinação de irradiação micro-ondas com ácido ou base podem ser usadas para melhorar a hidrólise enzimática ou a biodegradabilidade da biomassa lignocelulósica (BRANDT et al., 2013b; KUMAKURA; KOJIMA; KAETSU, 1982; TAHERZADEH; KARIMI, 2008; VEERAMANI KARUPPUCHAMY; KASIVISWANATHAN MUTHUKUMARAPPAN, 2009b; ZHU et al., 2006). Esta melhora na biodegradabilidade da biomassa exposta à irradiação micro-ondas parece estar relacionada ao aumento da sua área superficial acessível e ao tamanho de poros, bem como na redução da cristalinidade e do grau de polimerização da biomassa, tornando-a mais susceptível à ação enzimática (TAHERZEDH; KARINI, 2008; KAMUKURA et al., 1982).

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram com a literatura, pois sob irradiação micro-ondas a endoxilanase apresentou melhor desempenho, possivelmente, devido ao aumento da acessibilidade da enzima à fração hemicelulósica do material lignocelulósico. Entretanto, assim como na hidrólise da casca de soja *in natura* em reator com aquecimento convencional e com aquecimento micro-ondas, observou-se uma redução de AR no meio reacional – após 12 h no controle (41,4 mg de AR/g casca), após 24 h na reação catalisada com 80 U/g de casca (61,2 mg de AR/g casca) e após 18 h na reação catalisada com 100 U/g de casca (107,5 mg de AR/g casca). Sugere-se, portanto, que para obter máxima produção de AR, a hidrólise da casca de soja *in natura* deve ser conduzida por 18 h sob irradiação micro-ondas e utilizando 100 U/g casca.

4.8. Identificação de XOS

Os cromatogramas gerados por CLAE para identificação dos perfis de XOS produzidos são apresentados nas Figuras 29 a 39. Estes perfis se referem à reação controle (sem adição de enzima), e aos produzidos com a endoxilanase recombinante de *Bacillus*

subtilis ao hidrolisar a CS *in natura*, a CS desproteïnizada pré-tratada com H₂O₂ 5M, a CS desproteïnizada pré-tratada com organossolve-etanol 50% (v/v), a CS *in natura* pré-tratada com organossolve-etanol 50 e 70% (frações sólidas e líquidas) e a CS *in natura* em reator micro-ondas.

Pode-se observar na Figura 29 que na reação controle (sem adição da endoxilânase), diferentemente das demais Figuras (30 a 39), onde a enzima é utilizada, não houve a formação de XOS de baixa massa molecular (< 5 unidades de xilose). O cromatograma sugere a solubilização de hemicelulose como grandes oligômeros, mesmo o perfil de AR (Figura 17) sendo similar aos obtidos com a enzima endoxilânase. De fato, isto comprova que a enzima atuou na hidrólise da biomassa para produção dos XOS, entretanto, sua atuação foi limitada, demandando um pré-tratamento da biomassa.

Nas Figuras 30 a 39, observa-se formação preferencialmente de xilo-oligômeros de 2 e 3 unidades de xilose (xilobiose e xilotriose), X2 e X3, respectivamente, e em alguns casos traços de xilotetraose (X4) e xilopentaose (X5).

A atuação da endoxilânase sobre casca de soja *in natura* (Figuras 30 a 32, hidrólise em reator convencional e Figuras 38 e 39, hidrólise em reator micro-ondas) produziu hidrolisados com perfis de XOS semelhantes, além da solubilização de glicose, xilose e arabinose. Comportamento similar foi observado para os hidrolisados das frações líquidas dos pré-tratamentos organossolve-etanol 50 e 70%, v/v (Figuras 35 e 37, respectivamente).

Entretanto, as hidrólises das biomassas sólidas pré-tratadas por H₂O₂ 5 M (Figura 33) e organossolve-etanol 50 e 70% (v/v) (Figuras 34 e 36) produziram nos hidrolisados somente X2, X3 e X4. Estes resultados indicam que há uma fração da hemicelulose mais facilmente hidrolisável, a qual é solubilizada nos pré-tratamentos.

Deve-se ressaltar que as análises de XOS com 5 ou mais unidades de xilose não apresentam boa resolução devido as baixas concentrações e a limitações do método de análise utilizado. O maior pico observado nos cromatogramas em torno de 5 min se refere ao tampão citrato de sódio, podendo ocorrer co-eluição de oligômeros (> 6 unidades de xilose) nesse tempo de retenção.

Figura 29 – Xilo-oligossacarídeos (XOS) identificados por CLAE solubilizados (Controle) pela CS *in natura* (reator convencional) - cromatogramas para os tempos de 0 e 3 horas de hidrólise.

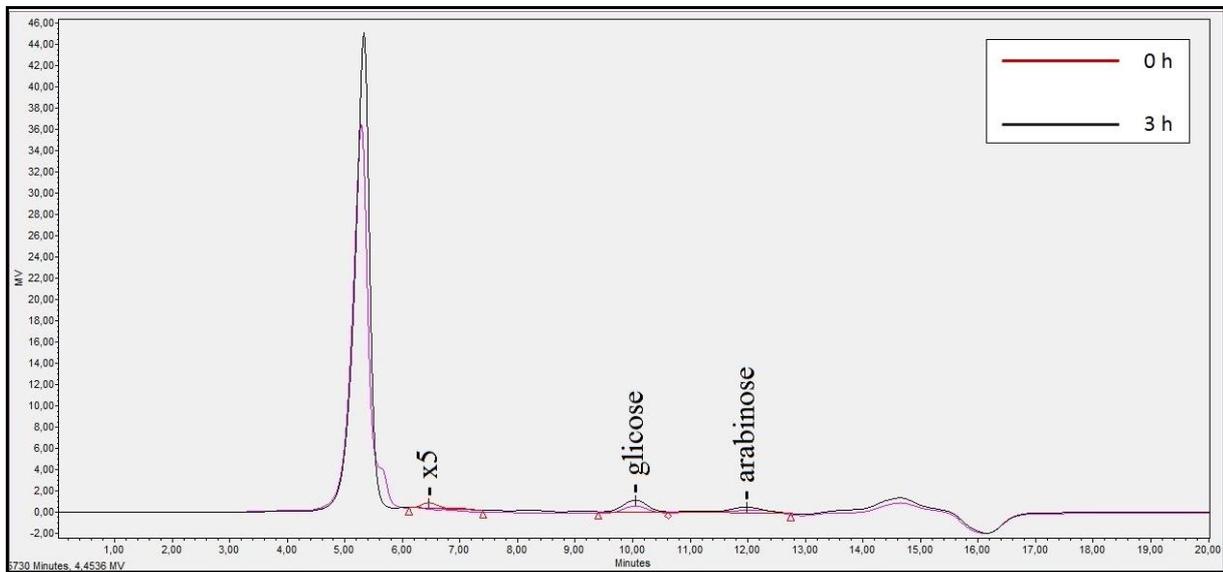


Figura 30 – Xilo-oligossacarídeos (XOS) identificados por CLAE produzidos por endoxilanas recombinante de *B. subtilis* (40 U/g de casca) para CS *in natura* (reator convencional) - cromatogramas para os tempos de 0 e 6 horas de hidrólise.

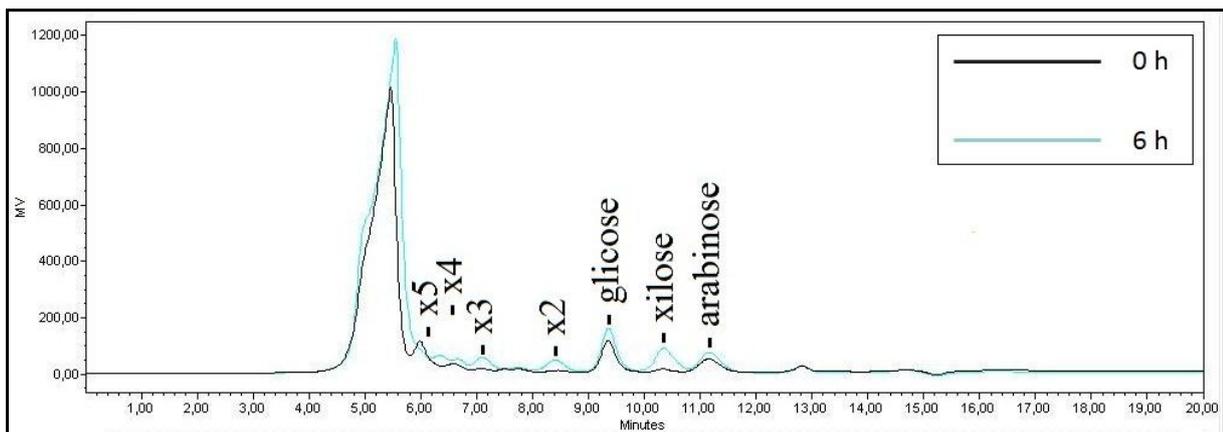


Figura 31 – Xilo-oligossacarídeos (XOS) identificados por CLAE produzidos por endoxilanase recombinante de *B. subtilis* (40 U/g de biomassa inicial + 20 U/g de biomassa cada 12 h) para CS *in natura* (reator convencional) - cromatogramas para os tempos de 0 e 24 horas de hidrólise.

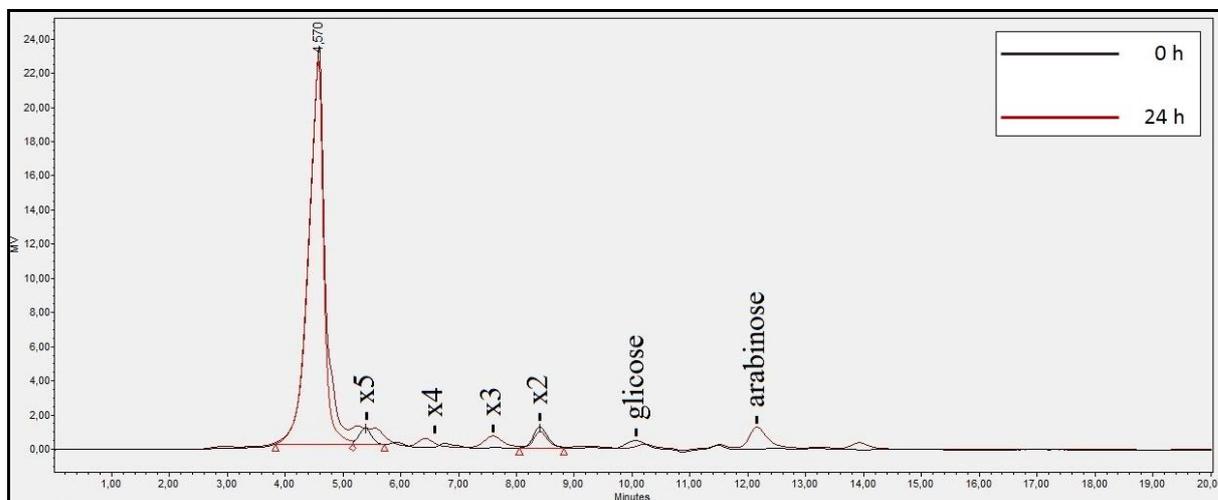


Figura 32 – Xilo-oligossacarídeos (XOS) identificados por CLAE produzidos por endoxilanase recombinante de *B. subtilis* (80 U/g de casca) para CS *in natura* (reator convencional) - cromatogramas para os tempos de 0 e 6 horas de hidrólise.

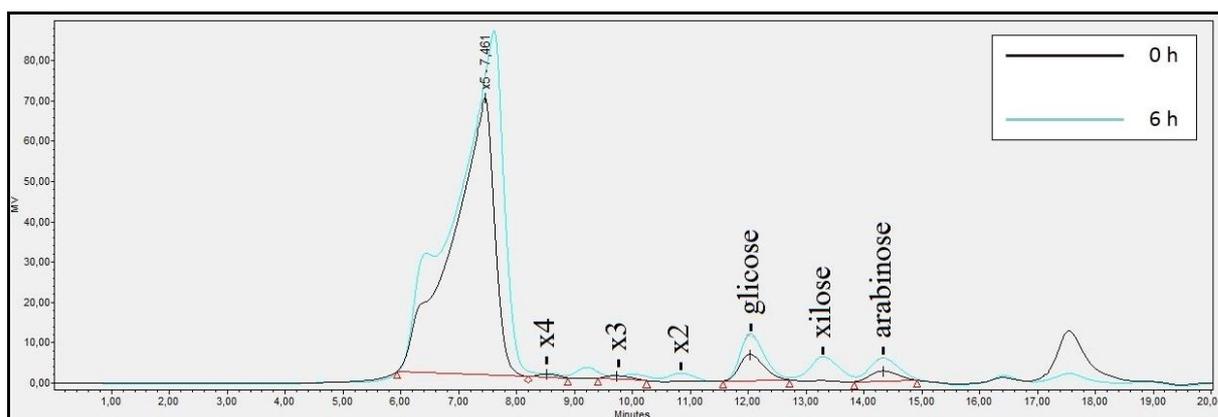


Figura 33 – Xilo-oligossacarídeos (XOS) identificados por CLAE produzidos por endoxilanase recombinante de *B. subtilis* (80 U/g de biomassa) para CS desproteínizada pré-tratada com H₂O₂ 5M - cromatogramas para os tempos de 0 e 60 horas de hidrólise.

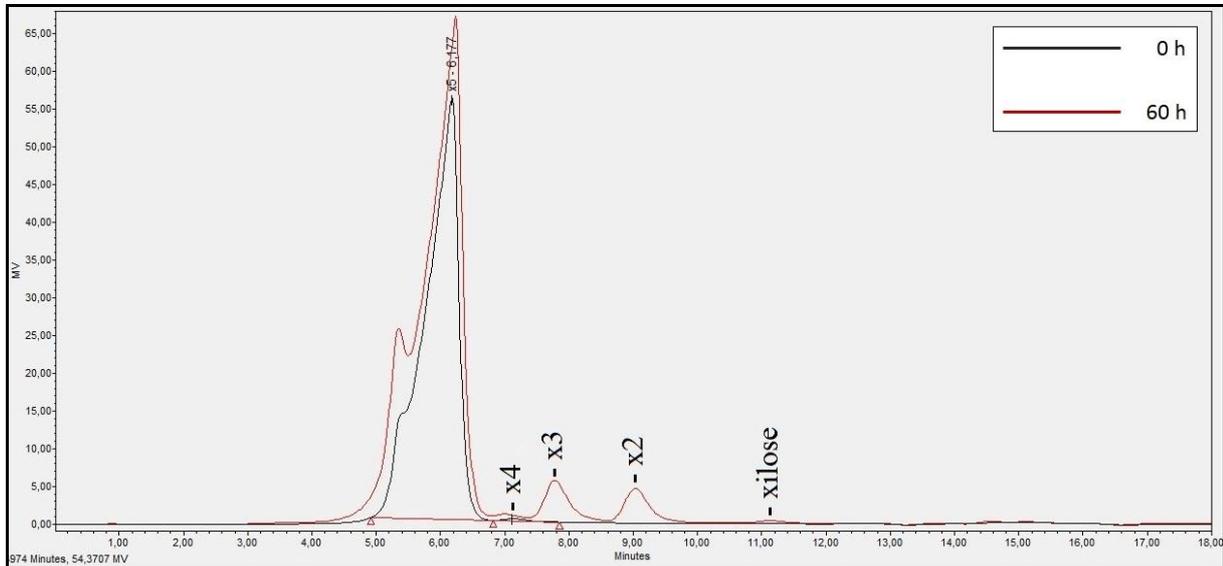


Figura 34 – Xilo-oligossacarídeos (XOS) identificados por CLAE produzidos por endoxilanase recombinante de *B. subtilis* (80 U/g de biomassa) para CS desproteínizada pré-tratada por organossolve-etanol 50% (v/v) - cromatogramas para os tempos de 0 e 12 horas de hidrólise.

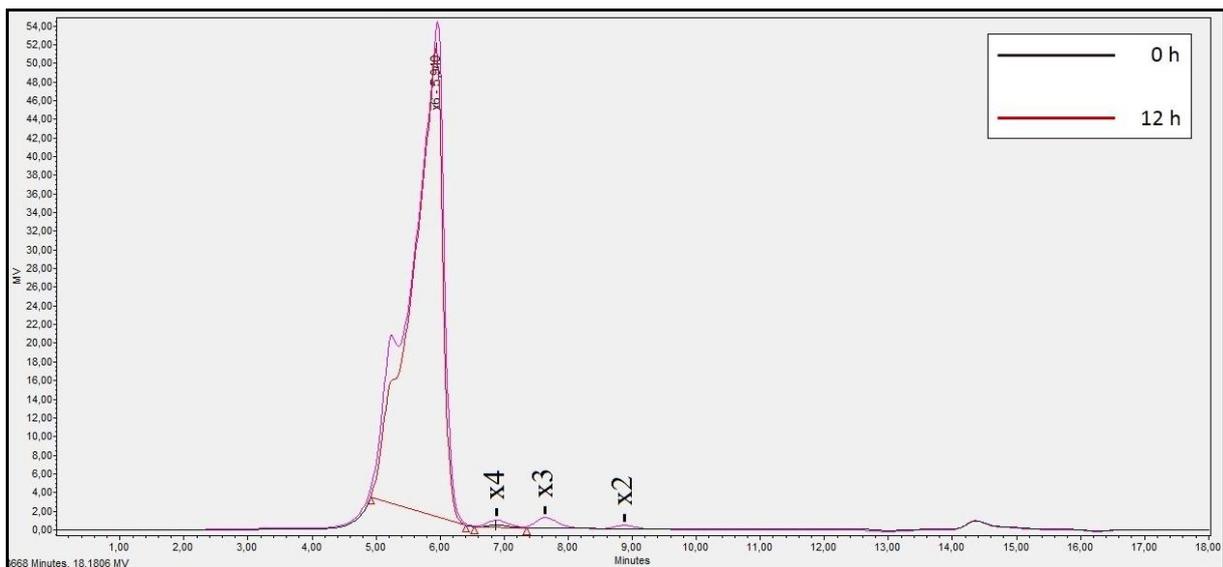


Figura 35 – Xilo-oligossacarídeos (XOS) identificados por CLAE produzidos por endoxilanasase recombinante de *B. subtilis* (7,3 U/mL) para a fração líquida da CS *in natura* pré-tratada por organossolve-etanol 50% (v/v) - cromatogramas para os tempos de 0 e 55 horas de hidrólise.

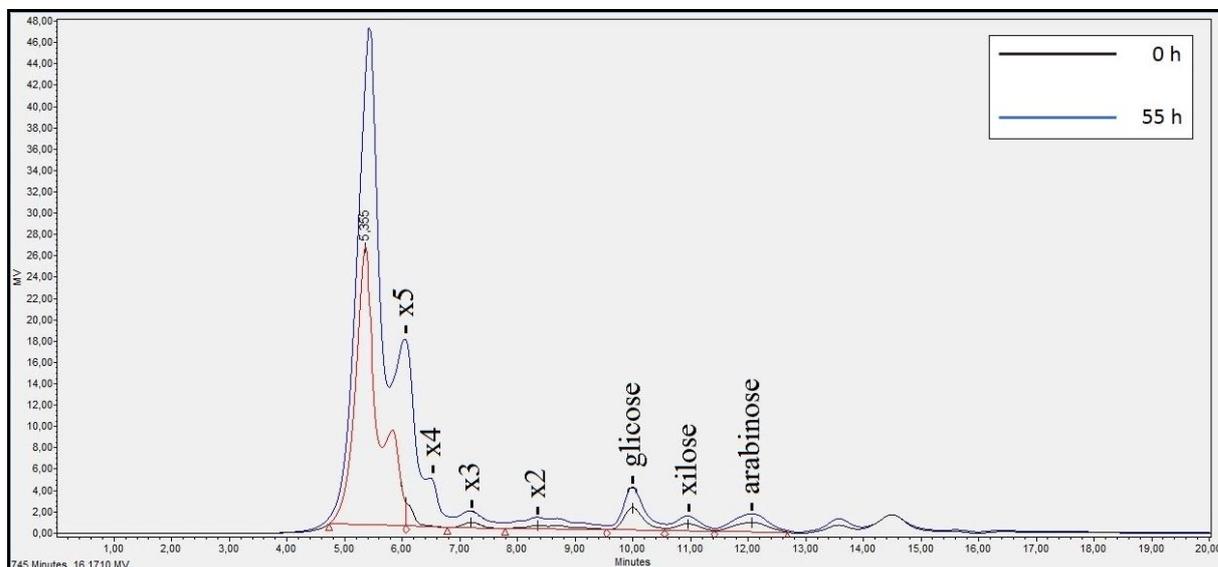


Figura 36 – Xilo-oligossacarídeos (XOS) identificados por CLAE produzidos por endoxilanasase recombinante de *B. subtilis* (80 U/g de biomassa) para CS *in natura* pré-tratada por organossolve-etanol 70% (v/v) - cromatogramas para os tempos de 0 e 24 horas de hidrólise.

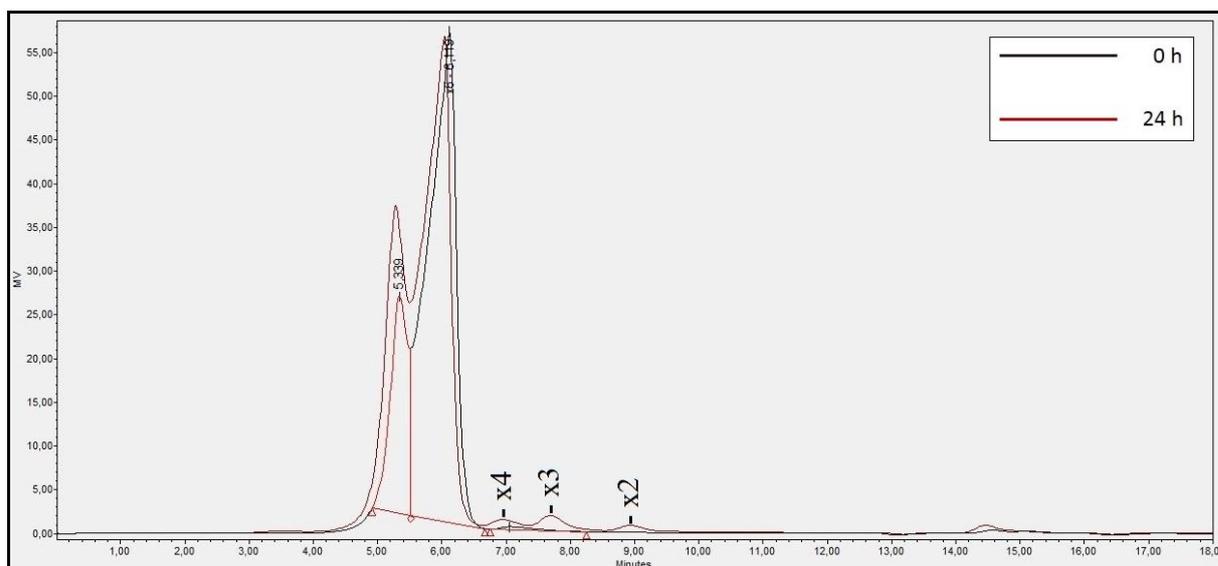


Figura 37 – Xilo-oligossacarídeos (XOS) identificados por CLAE produzidos por endoxilanase recombinante de *B. subtilis* (7,3 U/mL) para a fração líquida da CS *in natura* pré-tratada por organossolve-etanol 70% (v/v) - cromatogramas para os tempos de 0 e 55 horas de hidrólise.

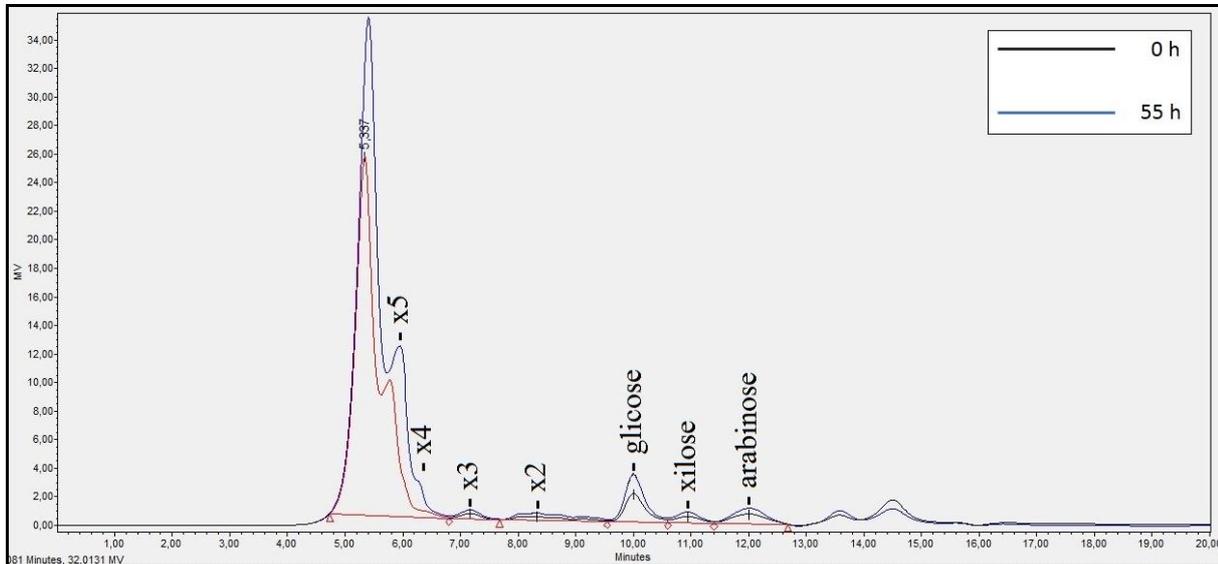


Figura 38 – Xilo-oligossacarídeos (XOS) identificados por CLAE produzidos por endoxilanase recombinante de *B. subtilis* (80 U/g de casca) para CS *in natura* (reator de micro-ondas) - cromatograma para o tempo de 12 horas de hidrólise.

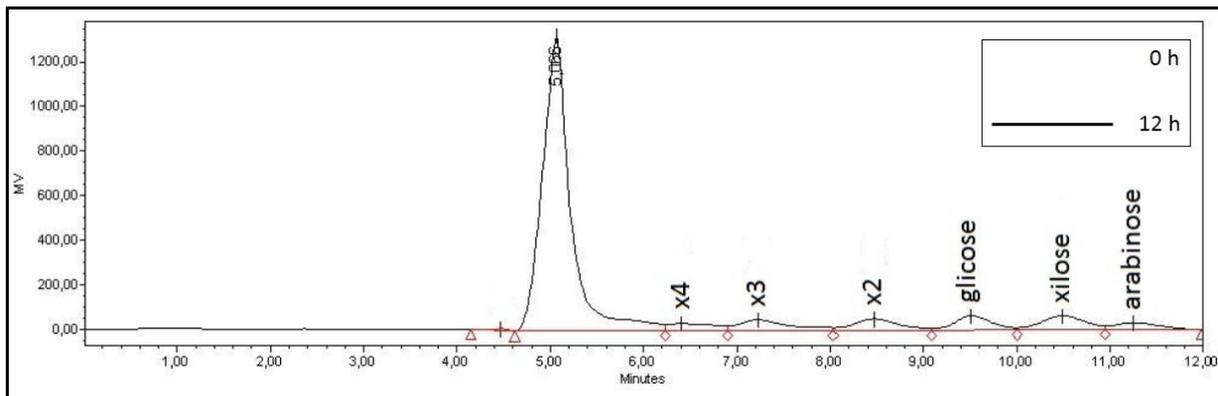
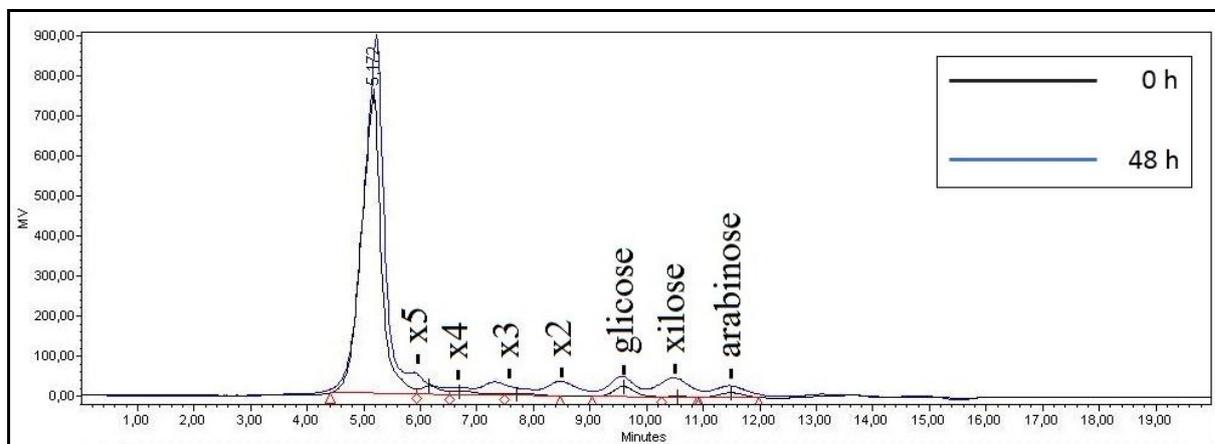


Figura 39 – Xilo-oligossacarídeos (XOS) identificados por CLAE produzidos por endoxilanas recombinante de *B. subtilis* (100 U/g de casca) para CS *in natura* (reator de micro-ondas) - cromatogramas para os tempos de 0 e 48 horas de hidrólise.



5. CONCLUSÕES

Com a intenção de obter as melhores condições para produção de xilo-oligossacarídeos por rota enzimática, este trabalho mostrou que a casca de soja possui potencial na produção de xilo-oligossacarídeos por rota enzimática.

A endoxilanase utilizada neste trabalho apresentou maior atividade a 45°C e pH 5,5 (tampão citrato de sódio 50 mM).

O aumento na carga enzimática na hidrólise da casca de soja *in natura* em reator convencional não aumentou a produção de AR. A diferença entre as concentrações máximas de AR, para a reação com adição de enzima, e o controle, reação sem enzima, foi de 12,43 mg AR/g biomassa.

Observou-se redução na concentração de AR para longos períodos de hidrólise, os quais não estavam relacionados à contaminação microbiana. A remoção de proteínas por hidrólise proteolítica contribuiu para a redução desse efeito, entretanto, teve efeito negativo para produção de XOS, apresentando menor formação de AR.

O pré-tratamento com peróxido de hidrogênio (5 M, 1 h) para casca de soja desproteïnizada removeu 56% de lignina sem perdas de celulose em relação a casca desproteïnizada. Entretanto, este pré-tratamento não contribuiu para a diminuição da recalcitrância da biomassa para uma eficiente atuação da endoxilanase sobre a fração hemicelulósica, resultando em baixa formação de AR na hidrólise enzimática.

O pré-tratamento organossolve-etanol 50% (v/v) da casca de soja desproteïnizada removeu em torno de 50% de lignina com baixa solubilização de hemicelulose (< 17%), gerando, portanto, um substrato pobre para a ação da endoxilanase. Já o pré-tratamento organossolve-etanol 50 e 70% (v/v) da casca de soja *in natura* foram capazes de solubilizar em torno de 30% da hemicelulose, sendo possível a produção de 76 e 49 mg de AR/g de biomassa seca, para os pré-tratamentos de 50 e 70% respectivamente, após hidrólise com endoxilanase.

A ação das micro-ondas sobre a biomassa lignocelulósica provavelmente reduziu a recalcitrância da biomassa, pois a hidrólise da casca *in natura* com endoxilanase (100 U/g de casca) produziu aproximadamente 100 mg de AR/g de biomassa seca, ao contrário da hidrólise conduzida em reator com aquecimento convencional com a mesma carga enzimática de 100 U/g de casca, que produziu em torno de 52 mg de AR/g de biomassa seca.

Conclui-se, então, que a hidrólise enzimática em reator micro-ondas em comparação aos pré-tratamentos químicos se destacou, produzindo a maior quantidade de AR com o menor número de processos, já que a hidrólise enzimática é feita com a casca *in natura*.

6. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Sugere-se para trabalhos futuros:

- Realizar o pré-tratamento peróxido de hidrogênio/ácido acético variando-se as concentrações dos reagentes a fim de analisar o perfil de remoção dos compostos, podendo-se também realizar o estudo da solubilização de hemicelulose e lignina para utilizar a fração líquida como substrato para hidrólise com a endoxilanase. Pode-se ainda estudar a variáveis tempo e temperatura.
- Como alternativa ao pré-tratamento organossolve-etanol, pode-se sugerir a realização do pré-tratamento hidrotérmico, que também utiliza altas temperaturas para remoção da fração de hemicelulose do complexo lignocelulósico, com menor remoção de lignina e dispensando a etapa de remoção do solvente orgânico (etanol);
- Ao utilizar a hemicelulose solubilizada na fração líquida com o uso de pré-tratamentos, pode-se sugerir realizar o estudo da imobilização enzimática com a utilização de suportes e também sem suportes (CLEAs), avaliando-se a sua reutilização, estabilidade, inibição e outros.
- A hidrólise enzimática em reator micro-ondas poderia ser realizada fixando a potência da irradiação micro-ondas, ou invés de fixar a temperatura, podendo também variar o tempo de reação e também, realizar o estudo da irradiação micro-ondas como pré-tratamento.
- Ao quantificar e identificar os XOS produzidos durante as hidrólises enzimáticas utilizando a CLAE e o método descrito anteriormente foi observado uma grande limitação do método em identificar XOS com mais de 4 unidades de xilose (>X4), além da necessária purificação e diluição das amostras, podendo subestimar os valores obtidos. Tendo em vista esta limitação sugere-se o uso de melhores métodos para essa crucial análise, como o método de cromatografia líquida de alta resolução com detecção por pulso amperométrico (HPAE-PAD), recomendado na literatura.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AACHARY, A. A.; PRAPULLA, S. G. Xylooligosaccharides (XOS) as an Emerging Prebiotic: Microbial Synthesis, Utilization, Structural Characterization, Bioactive Properties, and Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 10, n. 1, p. 2–16, 13 jan. 2011.

ADLER, E. Lignin chemistry-past, present and future. **Wood Science and Technology**, v. 11, n. 3, p. 169–218, 1977.

AGBOR, V. B. et al. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. **Biotechnology Advances**, v. 29, n. 6, p. 675–685, nov. 2011.

AKPINAR, O. et al. Comparison of acid and enzymatic hydrolysis of tobacco stalk xylan for preparation of xylooligosaccharides. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, n. 1, p. 119–125, jan. 2010.

ALEMDAR, A.; SAIN, M. Isolation and characterization of nanofibers from agricultural residues – Wheat straw and soy hulls. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 6, p. 1664–1671, abr. 2008.

ANTON PAAR GMBH. **Microwave-heated Systems: How does Microwave-assisted Heating Work.** Disponível em: <http://www.anton-paar.com/fileadmin/Themenseite/Expertise/ASC/probenvorbereitung_4_microwave.jpg>. Acesso em: 2 mar. 2015.

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. **Journal of Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 257–270, maio 1992.

BERNIER, R. et al. Isolation and Characterization of a Xylanase from *Bacillus subtilis*. **Applied and environmental microbiology**, v. 46, n. 2, p. 511–514, 1983.

BIAN, J. et al. Microwave-assisted acid hydrolysis to produce xylooligosaccharides from sugarcane bagasse hemicelluloses. **Food Chemistry**, v. 156, p. 7–13, 1 ago. 2014.

BOERJAN, W.; RALPH, J.; BAUCHER, M. Lignin Biosynthesis. **Annual Review of Plant Biology**, v. 54, n. 1, p. 519–546, jun. 2003.

BRAGATTO, J.; SEGATO, F.; SQUINA, F. M. Production of xylooligosaccharides (XOS) from delignified sugarcane bagasse by peroxide-HAc process using recombinant xylanase from *Bacillus subtilis*. **Industrial Crops and Products**, v. 51, p. 123–129, nov. 2013.

BRANDT, A. et al. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. **Green Chemistry**, v. 15, n. 3, p. 550–583, dez. 2013.

CASSALES, A. et al. Optimization of soybean hull acid hydrolysis and its characterization as a potential substrate for bioprocessing. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 11, p. 4675–4683, nov. 2011.

CHAPLA, D.; PANDIT, P.; SHAH, A. Production of xylooligosaccharides from corncob xylan by fungal xylanase and their utilization by probiotics. **Bioresource Technology**, v. 115,

p. 215–221, jul. 2012.

CHRISTOPHER, L. P.; YAO, B.; JI, Y. Lignin Biodegradation with Laccase-Mediator Systems. **Frontiers in Energy Research**, v. 2, n. March, p. 1–13, 31 mar. 2014.

COLLINS, T.; GERDAY, C.; FELLER, G. Xylanases, xylanase families and extremophilic xylanases. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 1, p. 3–23, jan. 2005.

CONAB. **Acompanhamento da safra brasileira de grãos**, v. 2 - Safra 2014/15, n. 9 - Nono levantamento, Brasília, p 1-109, jun. 2015. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 22 fev. 2015

COTTA, J. A. O. et al. Validação do método para determinação de nitrogênio kjeldahl total. **Revista Analytica**, v. 5, n. 26, p. 68-75, dez. 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, nov. 1993.

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.

DE LA TORRE, M. J. et al. Organosolv lignin for biofuel. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 58–63, fev. 2013.

DE SOUZA, W. R. Microbial Degradation of Lignocellulosic Biomass. In: **Sustainable Degradation of Lignocellulosic Biomass - Techniques, Applications and Commercialization**. [s.l.] InTech, 2013. p. 207–248.

DEREWENDA, U. et al. Crystal structure, at 2.6-Å resolution, of the *Streptomyces lividans* xylanase A, a member of the F family of beta-1,4-D-glycanases. **The Journal of biological chemistry**, v. 269, n. 33, p. 20811–4, 19 ago. 1994.

DODD, D.; CANN, I. K. O. Enzymatic deconstruction of xylan for biofuel production. **GCB Bioenergy**, v. 1, n. 1, p. 2–17, fev. 2009.

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.

DUMON, C. et al. Progress and future prospects for pentose-specific biocatalysts in biorefining. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 346–357, mar. 2012.

EMBRAPA. **A soja no Brasil**. Cnpso Embrapa Soja. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/SojanoBrasil.htm>>. Acesso em 18 set. 2014.

FARRELL, R. Enzymatic “Combustion”: The Microbial Degradation Of Lignin. **Annual Review of Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 465–505, 1 jan. 1987.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. Walter de Gruyter, 1983.

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.

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

GOMIDE, R. **Operações unitárias: operações com sistemas sólidos granulares**. São Paulo: Ed. Do Autor, 1980. v. 1

GOUVEIA, E. R. et al. Validação de metodologia para a caracterização química de bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 32, n. 6, 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.

HENDRIKS, A. T. W. M.; ZEEMAN, G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 10–18, jan. 2009.

IKEDA, S. et al. Community- and Genome-Based Views of Plant-Associated Bacteria: Plant-Bacterial Interactions in Soybean and Rice. **Plant and Cell Physiology**, v. 51, n. 9, p. 1398–1410, 1 set. 2010.

JEFFRIES, T. W.; YANG, V. W.; DAVIS, M. W. Comparative study of xylanase kinetics using dinitrosalicylic, arsenomolybdate, and ion chromatographic assays. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 70-72, n. 1, p. 257–265, mar. 1998.

KARUPPUCHAMY, V.; MUTHUKUMARAPPAN, K. **Enzymatic Hydrolysis of Microwave Pretreated Soy hull**. ASABE/CSBE North Central Intersectional Meeting. Anais. St. Joseph, MI: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009. Disponível em: <<http://elibrary.asabe.org/abstract.asp?JID=8&AID=29155&CID=smpnc&T=1>>. Acesso em: 18 fev. 2014.

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

KESHWANI, D. R. Biomass Chemistry. In: CHENG, J. (Ed.). **Biomass to Renewable Energy Processes**. 1. ed. CRC Press/Taylor & Francis, 2010. p. 7–40.

KUMAKURA, M.; KOJIMA, T.; KAETSU, I. Pretreatment of lignocellulosic wastes by combination of irradiation and mechanical crushing. **Biomass**, v. 2, n. 4, p. 299–308, out. 1982.

LABCONCO. **A guide to Kjeldahl Nitrogen Determination Methods and Apparatus**, 1998. Disponível em: <<http://www.expotechusa.com/catalogs/labconco/pdf/KJELDAHLguide.PDF>>. Acesso em: 15 fev. 2014.

LAROQUE, D. et al. Kinetic study on the Maillard reaction. Consideration of sugar reactivity. **Food Chemistry**, v. 111, n. 4, p. 1032–1042, 15 dez. 2008.

LENINGHER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 2 ed. São Paulo: Sarvier, 1995. 840 p.

- 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, ago. 2012.
- MADHUKUMAR, M. S.; MURALIKRISHNA, G. Structural characterisation and determination of prebiotic activity of purified xylo-oligosaccharides obtained from Bengal gram husk (*Cicer arietinum* L.) and wheat bran (*Triticum aestivum*). **Food Chemistry**, v. 118, n. 2, p. 215–223, jan. 2010.
- MÄKI-ARVELA, P. et al. Synthesis of Sugars by Hydrolysis of Hemicelluloses- A Review. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 9, p. 5638–5666, 14 set. 2011.
- MANDARINO, J. M. G.; ROESSING, A. C. Tecnologia para Produção de Óleo de Soja: Descrição das Etapas, Equipamentos, Produtos e Subprodutos. In: **Embrapa Soja**. 1^a. ed. Londrina: Embrapa Soja, 2001. p. 40.
- MANDELLI, F. et al. Simultaneous production of xylooligosaccharides and antioxidant compounds from sugarcane bagasse via enzymatic hydrolysis. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 770–775, jan. 2014.
- MESA, L. et al. The effect of organosolv pretreatment variables on enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. **Chemical Engineering Journal**, v. 168, n. 3, p. 1157–1162, abr. 2011.
- MIELLENZ, J. R. Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. **Current Opinion in Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 324–329, jun. 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. 2009.
- MILLER, G. L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426–428, mar. 1959.
- MOHAN, D.; PITTMAN, C. U.; STEELE, P. H. Pyrolysis of Wood/Biomass for Bio-oil: A Critical Review. **Energy & Fuels**, v. 20, n. 3, p. 848–889, maio 2006.
- 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, jul. 2001.
- MORETTI, M. M. D. S. et al. Pretreatment of sugarcane bagasse with microwaves irradiation and its effects on the structure and on enzymatic hydrolysis. **Applied Energy**, v. 122, p. 189–195, jun. 2014.
- MOSIER, N. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. **Bioresource Technology**, v. 96, n. 6, p. 673–686, abr. 2005.
- MURAKAMI, M. T. et al. Correlation of temperature induced conformation change with optimum catalytic activity in the recombinant G/11 xylanase A from *Bacillus subtilis* strain 168 (1A1). **FEBS Letters**, v. 579, n. 28, p. 6505–6510, nov. 2005.
- NABARLATZ, D.; EBRINGEROVÁ, A.; MONTANÉ, D. Autohydrolysis of agricultural by-products for the production of xylo-oligosaccharides. **Carbohydrate Polymers**, v. 69, n. 1, p. 20–28, 1 maio 2007.

- O'SULLIVAN, A. C. Cellulose: the structure slowly unravels. **Cellulose**, v. 4, n. 3, p. 173–207, 1997.
- OASMAA, A. et al. Fast Pyrolysis of Forestry Residue. 1. Effect of Extractives on Phase Separation of Pyrolysis Liquids. **Energy & Fuels**, v. 17, n. 1, p. 1–12, jan. 2003.
- OGEDA, T. L.; PETRI, D. F. S. Hidrólise Enzimática de Biomassa. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1549–1558, 2010.
- POLLET, A.; DELCOUR, J. A.; COURTIN, C. M. Structural determinants of the substrate specificities of xylanases from different glycoside hydrolase families. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 30, n. 3, p. 176–191, set. 2010.
- QING, Q. et al. Xylooligosaccharides Production, Quantification, and Characterization in Context of Lignocellulosic Biomass Pretreatment. In: **Aqueous Pretreatment of Plant Biomass for Biological and Chemical Conversion to Fuels and Chemicals**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2013. p. 391–415.
- RAMALINGAM, C.; HARRIS, A. Xylanases and its Application in Food Industry: A Review. **Journal of Experimental Sciences**, v. 1, n. 7, p. 1–11, 2010.
- RATANAKHANOKCHAI, K. et al. Paenibacillus curdlanolyticus Strain B-6 Multienzyme Complex: A Novel System for Biomass Utilization. In: **Biomass Now - Cultivation and Utilization**. InTech, 2013. p. 369–394.
- ROJAS, M. J. et al. Sequential proteolysis and cellulolytic hydrolysis of soybean hulls for oligopeptides and ethanol production. **Industrial Crops and Products**, v. 61, p. 202–210, nov. 2014.
- RULLER, R. et al. Efficient constitutive expression of Bacillus subtilis xylanase A in Escherichia coli DH5 α under the control of the Bacillus BsXA promoter. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 43, n. 1, p. 9, 1 jan. 2006.
- SAHA, B. C. Hemicellulose bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 5, p. 279–291, 1 maio 2003.
- SANTOS, P. **Uso de casca de soja ou bagaço de cana-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.
- SARKANEN, K. V.; LUDWIG, C. H. **Lignins: occurrence, formation, structure and reactions**. New York: Wiley-Interscience, 1971. 916 pp.
- SAXENA, R. C.; ADHIKARI, D. K.; GOYAL, H. B. Biomass-based energy fuel through biochemical routes: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 13, n. 1, p. 167–178, jan. 2009.
- SAXENA, V. K.; CHANDR, U. Microwave Synthesis: a Physical Concept. In: CHANDRA, U. (Ed.). **Microwave Heating**. InTech, 2011. p. 3–23.
- SEIBEL, N. F.; BELÉIA, A. D. P. Carboídratos das fibras de cotilédones e proteínas de produtos derivados de soja (Glycine max (L.) Merrill). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 607–613, set. 2008.

SESSA, D. J.; WOLF, W. J. Bowman – Birk inhibitors in soybean seed coats. **Industrial Crops and Products**, v. 14, n. 00, p. 73 – 83, 2001.

SLUITER, A. et al. Determination of Extractives in Biomass. **Biomass Analysis Technology Team Laboratory Analytical Procedure**, v. 1617, p. 1–8, 2004a.

SLUITER, A. et al. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. **Biomass Analysis Technology Team Laboratory Analytical Procedure**, v. 2011, n. July, p. 1–14, 2004b.

SUN, X. D. Enzymatic hydrolysis of soy proteins and the hydrolysates utilisation. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, n. 12, p. 2447–2459, 20 dez. 2011.

SUN, Y.; CHENG, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. **Bioresource Technology**, v. 83, n. 1, p. 1–11, maio 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. 1621–51, 1 set. 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, jul. 2010.

TAN, H. et al. Peroxide–Acetic Acid Pretreatment To Remove Bagasse Lignin Prior to Enzymatic Hydrolysis. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 49, n. 4, p. 1473–1479, 17 fev. 2010.

TEIXEIRA, L. C.; LINDEN, J. C.; SCHROEDER, H. A. Simultaneous Saccharification and Cofermentation of Peracetic Acid-Pretreated Biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 84–86, n. 1–9, p. 111–128, 2000.

TURINO, V. **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.

US DOE. May 2007. Biofuels Primer Placemat: From Biomass to Cellulosic Ethanol and Understanding Biomass: Plant Cell Walls, **US Department of Energy Office of Science**. Disponível em: <<http://genomicscience.energy.gov/biofuels/placemat.shtml>>. Acesso em: 23 mar. 2015.

USDA. Oilseeds: World Markets and Trade. **Foreign Agricultural Service/United States Department of Agriculture**. Disponível em: <<http://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/oilseeds.pdf>>. Acesso em: 07 dez. 2015.

VÁZQUEZ, M. . et al. Xylooligosaccharides: manufacture and applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, n. 11, p. 387–393, nov. 2000.

VYNOHRADOVA, R. P. Units of Enzyme Activity. Recommendations 1978. **European Journal of Biochemistry**, v. 97, n. 2, p. 319–320, jul. 1979.

WANG, F. et al. Improvement in the productivity of xylooligosaccharides from rice straw by feed xylanase with ultrafiltration. **Archives of Biological Sciences**, v. 63, n. 1, p. 161–166, 2011.

WILDSCHUT, J. et al. Ethanol-based organosolv fractionation of wheat straw for the production of lignin and enzymatically digestible cellulose. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 58–66, maio 2013.

WONG, K. K.; TAN, L. U.; SADDLER, J. N. Multiplicity of beta-1,4-xylanase in microorganisms: functions and applications. **Microbiological reviews**, v. 52, n. 3, p. 305–317, 1988.

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, 20 dez. 2011.

ZHAO, X.; ZHANG, L.; LIU, D. Biomass recalcitrance. Part II: Fundamentals of different pre-treatments to increase the enzymatic digestibility of lignocellulose. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 6, n. 5, p. 561–579, 13 set. 2012.

ZHU, S. et al. The effect of microwave irradiation on enzymatic hydrolysis of rice straw. **Bioresource technology**, v. 97, n. 15, p. 1964–8, out. 2006.