UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Escola de Engenharia de Lorena - EEL

MILENA MOREIRA LOPES

**Avaliação do hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho
suplementado com proteína de farelo de soja solubilizada para
obtenção de bioetanol**

Lorena

2015

MILENA MOREIRA LOPES

**Avaliação do hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho
suplementado com proteína de farelo de soja solubilizada para obtenção
de bioetanol**

Dissertação de Mestrado apresentado a Escola de
Engenharia de Lorena-SP da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências do Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia Industrial na área de concentração
Microbiologia Aplicada.

Orientadora: Profa. Dr^a Rita de Cássia Lacerda
Brambilla Rodrigues.

Edição reimpressa e corrigida

Lorena

Dezembro, 2015

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARAFINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Lopes, Milena Moreira

Avaliação do hidrolisado hemicelulósico de sabugo
de milho suplementado com proteína de farelo de soja
solubilizada para obtenção de bioetanol / Milena
Moreira Lopes; orientadora Rita de Cássia Lacerda
Brambilla Rodrigues - ed. reimp., corr. - Lorena,
2015.

106 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de
Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de
Lorena da Universidade de São Paulo. 2015
Orientadora: Rita de Cássia Lacerda Brambilla
Rodrigues

1. Etanol. 2. *Scheffersomyces stipitis*. 3.
Hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho. 4.
Farelo de soja. 5. Fermentação. I. Título. II.
Rodrigues, Rita de Cássia Lacerda Brambilla, orient.

Dedico este trabalho aos meus pais, Denise e Tiago, e as minhas irmãs, Laís e Nathália, que sempre torceram por mim e por seu amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

Um agradecimento especial à minha orientadora, Profa. Dr^a Rita de Cássia Lacerda Brambilla Rodrigues, pela sua dedicação, carinho, amizade e pela sabedoria compartilhada.

A toda minha família, tias, tios, avô Vitor, primas e primos, em especial aos meus pais, minha fonte de inspiração e exemplo de vida, minhas irmãs e minhas avós Laice e Nancy.

A meu namorado Lucas, pela paciência, companheirismo e principalmente pela felicidade que é estar ao seu lado.

A todos os amigos que eu fiz durante o mestrado, Thaís, Barbara, Daniele, em especial aos meus amigos Ricardo e Eduardo, que viraram verdadeiros irmãos pra mim.

A todos meus amigos de longa data que sempre me apoiaram em tudo que faço, em especial Isabela, Sis, Ana Júlia, Roberta, Lazara e Nikolas.

Quero agradecer aos meus amigos de laboratório Renan, Rodolfo, Claudia, Renita e Eduardo. Aos técnicos de laboratório tão queridos Paulinho e Nicamor.

Aos professores Arnaldo Marcio, João Batista, Maria Bernadete, Eliana e Maria das Graças pela ajuda oferecida durante a realização deste trabalho.

A Capes pelo apoio financeiro.

Ao Rafael Benicio, gerente executivo na Granjatec Internacional, pela doação do farelo de soja empregado neste trabalho e pela disposição em sempre nos ajudar.

A Escola de Engenharia de Lorena (EEL/USP), todos os amigos, professores e funcionários que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

LOPES, M.M; **Avaliação do hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho suplementado com proteína de farelo de soja solubilizada para obtenção de bioetanol.** 2015. 106p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo, 2015.

O sabugo de milho, devido a sua estrutura lignocelulósica, pode servir como fonte de biomassa renovável na produção de açúcares solúveis que podem ser convertidos em produtos de elevados valores agregados, como etanol e outros. A hidrólise ácida é o método mais utilizado na obtenção de hidrolisado hemicelulósico de materiais lignocelulósicos ricos em açúcares fermentescíveis, sendo o açúcar xilose em maior concentração. A levedura fermentadora de xilose *Scheffersomyces stipitis* está entre os poucos organismos que utilizam a xilose e a glicose e exibem um sistema regulatório de transição entre o processo respiratório e o fermentativo. Este trabalho teve como objetivo contribuir para o desenvolvimento de uma tecnologia de obtenção de bioetanol por *S. stipitis* CBS 6054, a partir da fração hemicelulósica do sabugo de milho, avaliando a formulação nutricional do meio de fermentação. Como fonte de nitrogênio alternativa foi escolhida o farelo de soja. O hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho (HHSM), obtido por hidrólise ácida, foi concentrado a vácuo e tratado pela elevação e abaixamento de pH. O hidrolisado de farelo de soja foi obtido por hidrólise enzimática (Alcalase, 60⁰C, 100 rpm, 3h). Para avaliar a solubilidade do hidrolisado de farelo de soja em HHSM (pH de 4,0 a 7,0) empregou-se planejamento fatorial 2² completo com análise de superfície de resposta (RSM). A suplementação do HHSM com a proteína de farelo de soja solubilizada em associação ou não com outros nutrientes (ureia e sulfato de amônio) na obtenção de bioetanol por *S. stipitis* foi avaliada por meio de um planejamento fatorial 2³ completo com RSM. A fermentação foi realizada em frascos de Erlenmeyer (125 mL) contendo 50 mL de meio sob agitação de 150 rpm e 30 °C. A concentração de inóculo foi de 1,5 g/L de células. Os resultados mostraram que a hidrólise ácida favoreceu a remoção da fração hemicelulósica (88,05%) com pouca alteração na celulose (10,06%) e da lignina (27,07%) com relação ao material *in natura*, proporcionando um hidrolisado hemicelulósico rico em xilose (28,30 g/L) com baixas concentrações de compostos fenólicos e furanos. O tratamento do HHSM reduziu seu teor proteico em relação ao hidrolisado concentrado (74,76%) e hidrolisado original (28,53%). O farelo de soja foi de boa qualidade apresentando solubilidade da proteína em KOH igual a 82,99% e índice de urease igual a 0,00. A hidrólise enzimática de farelo de soja hidrolisou 50,45% mais proteína do que a extração aquosa de proteína de farelo de soja, obtendo-se 45 g/L de proteína solubilizada. Na quantificação de proteína pelo método de Lowry foi necessário levar em consideração a presença de espécies interferentes do HHSM. A máxima solubilização da proteína de soja (9,02 g/L) em HHSM foi obtida maximizando a concentração de hidrolisado de farelo de soja (5,0 g/L). O pH, nos níveis estudados, não influenciou a solubilização da proteína de soja em HHSM. Pela RMS, o valor máximo para o fator de conversão de açúcares em etanol (0,20 g/g) pode ser alcançado empregando-se hidrolisado de farelo de soja em seu nível superior (5,0 g/L) e uréia (3 g/L) e sulfato de amônio (3,0 g/L) em seus pontos centrais. A fonte de proteína de farelo de soja solubilizada em HHSM tem potencial como fonte de nitrogênio alternativa na produção de bioetanol por *Scheffersomyces stipitis*.

Palavras-chave: Etanol, *Scheffersomyces stipitis*, Hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho, Farelo de soja, Fermentação.

ABSTRACT

LOPES, M.M; **Evaluation of corn cob hemicelulosic hydrolysate supplemented with soluble soybean meal protein for obtainment of bio-ethanol.** 2015. 106p. Dissertation (Master of science) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, São Paulo, 2015.

The corn cob, due to its lignocellulosic structure, can be used as a biomass renewable source for soluble sugars can be converted into high value-added products, such as ethanol and others. Acid hydrolysis is the mostly used method to obtain hemicelulosic hydrolysate from lignocellulosic materials, leading to the obtaining of the xylose sugar at the highest concentration, from their hemicelulosic fraction. The xylose fermenting yeast *Scheffersomyces stipitis* is among the few organisms that utilize both xylose and glucose regulatory systems and exhibits a transition between the respiratory and fermentative processes. This work aims to contribute to the development of a technology to obtain bioethanol by *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054, from the corn cob hemicelulosic fraction, evaluating the nutritional formulation of the fermentation medium. As an alternative of nitrogen source, it was chosen soybean bran. The corn cob hemicelulosic hydrolysate (HHSM) was obtained by acid hydrolysis, vacuum evaporated and treated by pH variation. Hydrolysate of soybean bran was obtained by enzymatic hydrolysis (Alcalase, 60°C, 100 rpm, 3h). The solubility evaluation of the hydrolysate of soybean bran in HHSM (pH 4.0 to 7.0) was performed by 2² full factorial design using response surface methodology (RSM). The supplementation of HHSM with solubilized soybean bran protein associated or not with other nutrients (urea and ammonium sulphate) to obtain bioethanol employed a 2³ full factorial design using RSM. The fermentation was carried out in Erlenmeyer flasks (125 mL) containing 50mL of medium stirred at 150rpm and 30 °C. The inoculum concentration was 1.5 g/L of cells. The results showed that the acid hydrolysis favored removal of the hemicelulosic fraction (88.05%) with little change in cellulose (10.06%) and lignin (27.07%) compared to the *in natura* material, providing a hemicelulosic hydrolysate rich in xylose (28.30 g/L) with low concentrations of phenolics compounds and furans. Treatment of HHSM reduced protein content in the vacuum evaporated hydrolysate (74.76%) and original hydrolysate (28.53%). Soybean bran had good quality as shown by the protein solubility of KOH of 82.99 % and by urease index of 0.00. The soybean bran enzymatic hydrolysis produced 50.45% more protein than aqueous soybean bran protein extraction, yielding 45 g/L of solubilized protein. In the determination of protein content by the Lowry method was necessary to take into account the presence of interfering species of the HHSM. The maximum soybean bran protein solubility (9.01 g/L) was obtained maximizing the concentration of hydrolysate of soybean bran (5.0 g /L) in HHSM. In the range studied in this work, the pH did not influence the solubility of soybean bran protein in HHSM. For the response surface methodology, the maximum value for the ethanol yield (0.20 g/g.) can be achieved employing hydrolysate of soybean bran in its upper level (5.0 g/L) and urea (3 g/L) and ammonium sulfate (3 g/L) in their center points. The source of soybean bran protein solubilized in HHSM has potential as an alternative nitrogen source for bioethanol production by *Scheffersomyces stipitis*.

Keywords: Ethanol. *Scheffersomyces stipitis*, Corn cob hemicelulosic hydrolysate, Soybean bran, Fermentation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1: Esquema estrutural simplificado das fibras do material lignocelulósico.....	24
Figura 3.2: Estrutura química parcial da hemicelulose.	25
Figura 3.3: Representação esquemática da estrutura química parcial de xilana de gramíneas, com ácido ferúlico ligado ao O-5 da cadeia lateral de arabinofuranosil.	29
Figura 3.4: Metabolismo de D-xilose em leveduras.....	35
Figura 3.5: Fluxograma do processo de produção do farelo de soja.	42
Figura 5.1: Avaliação de interferentes durante a quantificação de proteína em farelo de soja empregando o método de Lowry nas condições: adicionadas de BSA (■) e sem adição de BSA (●).....	71
Figura 5.2: Avaliação de interferentes durante a quantificação de proteína em hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho empregando o método de Lowry, nas seguintes condições: A) pH 4; adicionadas de BSA (■) e sem adição de BSA (●); B) pH 5,5; adicionadas de BSA (■) e sem adição de BSA (●); C) pH 7,0; adicionadas de BSA (■) e sem adição de BSA (●).....	73
Figura 5.3: Avaliação de interferentes durante a quantificação de proteína em hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho suplementado com a proteína de farelo de soja empregando o método de Lowry, nas seguintes condições: A) pH 4; adicionadas de BSA (■) e sem adição de BSA (●); B) pH 5,5; adicionadas de BSA (■) e sem adição de BSA (●); C) pH 7,0; adicionadas de BSA (■) e sem adição de BSA (●).	74
Figura 5.4: Superfície de resposta e curvas de nível do modelo proposto que representa a concentração de proteína solubilizada de farelo de soja em hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho em função das variáveis farelo de soja (FS) e pH inicial do hidrolisado.	80
Figura 5.5: Perfil de crescimento celular (●), consumo de açúcares (▲) e produção de etanol (■) durante a fermentação em hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho pela levedura <i>S. stipitis</i> nas condições nutricionais determinadas pela metodologia estatística.	91
Figura 5.6: Superfície de resposta e curvas de nível do modelo proposto que representa o fator de conversão de açúcares em etanol ($Y_{p/s}$) em hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho por <i>S. stipitis</i> em função das variáveis farelo de soja (FS) e Ureia (U).	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Composição aproximada de alguns tipos de materiais lignocelulósicos.	23
Tabela 3.2: Padrão de atividade urease da soja e do farelo.	43
Tabela 3.3: Padrão da solubilidade da proteína em KOH na soja e farelo.	43
Tabela 4.1: Fatores e níveis avaliados no planejamento fatorial 2^2 completo.	48
Tabela 4.2: Fatores e níveis avaliados no planejamento fatorial 2^3 completo.	50
Tabela 5.1: Componentes estruturais e não estruturais do sabugo de milho	63
Tabela 5.2: Caracterização dos Hidrolisados: original (HO), concentrado (HC), concentrado e tratado (HCT).	65
Tabela 5.3: Composição química centesimal (g/100g) do farelo de soja.	68
Tabela 5.4: Solubilização da proteína de farelo de soja em hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho em diferentes níveis de pH e com adição de diferentes concentrações de hidrolisado de farelo de soja de acordo com planejamento fatorial 2^2 com fase centrada e 3 repetições no ponto central (Tabela 5.5).	75
Tabela 5.5: Matriz para a concentração de proteína solubilizada de farelo de soja, apresentando os níveis codificados e naturais de um planejamento fatorial 2^2 com face centrada e 3 repetições no ponto central.	76
Tabela 5.6: Análise de variância (ANOVA) para a concentração de proteína solubilizada de Farelo de Soja em hidrolisado seguindo um planejamento fatorial 2^3 com face centrada e 3 repetições no ponto central.	77
Tabela 5.7: Coeficiente de Regressão, Erros-Padrão e valor de p do modelo estatístico para a concentração de proteína solubilizada em hidrolisado de sabugo por seguindo um planejamento fatorial 2^2 com face centrada e 3 repetições no ponto central.	77
Tabela 5.8: Análise de variância para o ajuste de um modelo quadrático aos dados da Tabela 5.6, que representa a concentração de proteína solubilizada de farelo de soja em hidrolisado de sabugo.	78
Tabela 5.9: Consumo de açúcares, produção de etanol, células e glicerol por <i>S. stipitis</i> CBS 6054 em frascos agitados contendo meio hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho após 120h á 30 °C e pH 5,5 suplementado de acordo com planejamento fatorial apresentado na (Tabela 5.5).	83
Tabela 5.10: Concentração de ácido acético, condutividade e pH do meio de fermentação, para os ensaios referentes à matriz estatística (Tabela 4.2).	84

Tabela 5.11: Parâmetros fermentativos da bioconversão de açúcares em etanol ($Y_{p/s}$) e de açúcares em células ($Y_{x/s}$) por <i>S. stipitis</i> CBS 6054 em frascos agitados contendo meio hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho após 120 h á 30 °C e pH 5,5 suplementado de acordo com planejamento fatorial apresentado na (Tabela 5.5).	86
Tabela 5.12: Matriz para o fator de conversão de açúcares em etanol por <i>S. stipitis</i> apresentando os níveis codificados e naturais de um planejamento fatorial 2^3 com face centrada e 3 repetições no ponto central.	88
Tabela 5.13: Análise de variância (ANOVA) para o fator de conversão de açucares em etanol seguindo um planejamento fatorial 2^3 com face centrada e 3 repetições no ponto central.....	89
Tabela 5.14: Coeficiente de Regressão, Erros-Padrão e valor de p do modelo estatístico para o fator de conversão de açucares em etanol seguindo um planejamento fatorial 2^2 com face centrada e 3 repetições no ponto central.	89
Tabela 5.15: Análise de variância para o ajuste de um modelo quadrático aos dados da Tabela 5.13, que representa o fator de conversão de xilose em etanol.	90

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	22
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1. Materiais lignocelulósicos	23
3.2. Sabugo de milho	28
3.3. Etanol combustível	29
3.4. Etanol de primeira e segunda geração	31
3.5. Obtenção de etanol por via biotecnológica.....	32
3.5.1 Obtenção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico	33
3.6. Farelo de soja: fonte de nitrogênio alternativa.....	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1. Hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho	46
4.1.1 Obtenção e preparo da matéria-prima (sabugo de milho).....	46
4.1.2 Hidrólise ácida do sabugo de milho.....	46
4.1.3 Concentração a vácuo	47
4.1.4 Tratamento e autoclavagem	47
4.2 Hidrólise da proteína de farelo de soja	47
4.2.1 Obtenção e Preparo da Matéria-Prima.....	47
4.2.2 Hidrolise enzimática do farelo de soja.....	48
4.3 Avaliação da solubilidade da proteína extraída do farelo de soja em hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho	48
4.4 Avaliação da suplementação nutricional do hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho com proteína de farelo de soja solubilizada	49
4.4.1 Microrganismo.....	49

4.4.2 Preparo do inóculo	49
4.4.3 Meio de fermentação, condições de fermentação e metodologia estatística.....	49
4.5. Métodos analíticos	50
4.5.1. Determinação do teor de umidade das matérias-primas: sabugo de milho e farelo de soja	50
4.5.2. Análise composicional do sabugo de milho <i>in natura</i> e após hidrólise ácida	51
4.5.3. Caracterização do Farelo de Soja.....	55
4.5.4. Determinação do teor de proteína no hidrolisado hemicelulósico de sabugo de Milho na presença ou ausência de farelo de soja.....	57
4.5.5. Determinação da atividade específica da enzima alcalase.....	58
4.5.6. Pureza da cultura, viabilidade e morfologia celular.....	58
4.5.7. Determinação da concentração celular	59
4.5.8. Determinação da concentração de açúcares, ácido acético, glicerol, etanol e xilitol.....	59
4.5.9. Determinação da concentração de furfural, hidroximetilfurfural, ácido p-hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido siringico, vanilina, ácido p-cumárico e ácido ferúlico.....	59
4.5.10. Determinação da concentração de fenóis totais	60
4.5.12. Determinação do pH e condutividade elétrica do hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho	61
4.6. Determinação dos parâmetros fermentativos	61
4.6.1. Fator de conversão de D-xilose em etanol e de D-xilose em célula	61
4.6.2. Produtividade volumétrica de etanol (Q_p).....	62
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1 Caracterização química do sabugo de milho.....	63
5.1.1. Hidrolisado Hemicelulósico de Sabugo de Milho	64
5.2 Caracterização Farelo de Soja.....	68
5.3 Avaliação da solubilidade da proteína extraída do farelo de soja em hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho	70

5.3.1. Hidrolise enzimática do farelo de soja.....	70
5.3.1.1. Avaliação de interferentes durante a quantificação de proteína de soja em hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho empregando o método de Lowry.....	70
5.3.2. Avaliação da solubilidade da proteína extraída do farelo de soja.....	76
5.4 Processos Fermentativos.....	81
5.4.1 Avaliação da suplementação nutricional do hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho com proteína de farelo de soja solubilizada	81
6. CONCLUSÃO.....	93
7. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS.....	95
REFERÊNCIAS.....	96

1 INTRODUÇÃO

Com a preocupação em preservar o meio ambiente de forma a garantir o seu desenvolvimento por meio de ações sustentáveis e cientes de que as reservas de petróleo são limitadas, os países são impulsionados a desenvolverem novas tecnologias que utilizem matérias primas renováveis e competitivas. Muitos produtos finais e intermediários químicos de grande interesse para a humanidade, hoje originários do petróleo, podem também ser produzidos a partir de matérias primas renováveis, em particular da biomassa vegetal, diminuindo assim uma parcela da poluição ambiental.

O Brasil dispõe de grande variedade de resíduos agrícolas e agroindustriais, cujo processamento desperta um grande interesse econômico e social. Dentre estes, figuram-se unidades de produção agrícola geradoras de resíduos de palha de cereais, de milho, de trigo, sabugo de milho, cascas de arroz e de aveia, dentre outros. Sabugo de milho é um resíduo sólido produzido em grande volume que resulta do processamento do milho e que atualmente é utilizado como alimento para animais ou devolvido à lavoura para aplicação no solo (RAMOS, 2000).

Sabugo de milho, material lignocelulósico, contém celulose, um polissacarídeo que pode ser convertido em glicose, hemicelulose, que é um heteropolímero de pentoses e hexoses e que correspondem de 10 a 40% da matéria seca dos resíduos lignocelulósicos e lignina. A hidrólise ácida é o método mais utilizado na obtenção de hidrolisado hemicelulósico de materiais lignocelulósicos. Este processo exige alta pressão e temperatura e gera açúcares fermentecíveis, sendo que da fração hemicelulósica obtém-se o açúcar xilose em maior concentração (RODRIGUES, 2005).

As frações celulósica e hemicelulósica podem servir como fonte de biomassa renovável na produção de açúcares solúveis que, por processos químicos, enzimáticos e fermentativos, podem ser convertidos em produtos de elevado valor agregado como o etanol. A bioconversão da xilose em etanol é uma das importantes vias dentro do conceito de uma biorrefinaria. No Brasil, o uso de etanol como combustível é destaque mundial pelo pioneirismo e pelos volumes produzidos e consumidos no país.

A levedura fermentadora de xilose *Scheffersomyces stipitis* está entre os poucos organismos que utilizam a xilose e a glicose e exibem um sistema regulatório de transição entre o processo respiratório e o fermentativo. Na levedura Crabtree-negativa *Scheffersomyces stipitis*, limitação de oxigênio, ao invés da presença tanto de glicose ou

xilose, induz fermentação. Além do oxigênio disponível outros fatores podem interferir nesta bioconversão como pH, temperatura, presença de compostos tóxicos, nutrientes e outros (JEFFRIES, 1985).

Este trabalho teve como objetivo contribuir para o desenvolvimento de uma nova tecnologia de obtenção de etanol por via biotecnológica, a partir da fração hemicelulósica do sabugo de milho avaliando a formulação nutricional do meio de fermentação. Como fonte de nitrogênio alternativa foi escolhida o farelo de soja devido à grande importância da soja e seus subprodutos na economia brasileira.

O farelo de soja possui uma variedade de aplicações, como o enriquecimento de alimentos e a obtenção de concentrados e isolados de proteína, embora a maior parte do farelo de soja ainda seja destinada às rações animais. O farelo de soja constitui uma matéria-prima de qualidade nutricional, pois contém aproximadamente 50% de proteína.

Durante o processamento da soja integral, utilizando o calor, tem-se como objetivo principal alcançar um equilíbrio ótimo entre a degradação de fatores antinutricionais e manutenção da disponibilidade de aminoácidos. De acordo com Butolo (2002), para avaliar o grau de processamento térmico da soja existem vários métodos, sendo os métodos oficiais a atividade de urease, o índice de dispersibilidade de proteína e o índice de solubilidade do nitrogênio. No entanto, a atividade de urease e a solubilidade da proteína em hidróxido de potássio têm sido relevantes devido à facilidade de execução e ao baixo custo laboratorial.

Pode-se fazer uma hidrólise do farelo de soja, liberando os aminoácidos das proteínas para facilitar o metabolismo desses compostos pelos microrganismos. Esta hidrólise pode ser realizada por enzimas, ácidos ou álcalis. Conforme Clemente (2000) as hidrólises ácida ou alcalina tendem a ser um processo difícil de se controlar e resulta produtos com reduzidas qualidades nutricionais. As hidrólises ácida e alcalina são totalmente inespecíficas, podendo destruir aminoácidos como triptofano, lisina, treonina ou causar a racemização da maioria dos L-aminoácidos, comprometendo o valor nutricional da proteína (ADLER-NISSEN, 1981). A hidrólise enzimática é desenvolvida sob condições suaves em valores de pH de 6,00 a 8,00 e temperatura entre 40 e 60 °C, evitando os extremos usualmente necessários para os tratamentos físicos e químicos, e minimizando reações paralelas, permitindo um bom controle da hidrólise e, assim, das propriedades dos produtos resultantes (CLEMENTE, 2000). A solubilidade é uma das propriedades mais importantes das proteínas de soja, sendo necessário conhecer o comportamento dela em

diferentes meios para uma aplicação adequada. Conforme Ordonez et al. (2005), a solubilidade da proteína é medida pelo índice de solubilidade de nitrogênio, isto é, a porcentagem de proteína que se mantém em solução ou dispersão coloidal sob condições específicas e que não sedimenta com forças centrífugas moderadas.

Neste contexto, este trabalho também propôs a solubilização da proteína de farelo de soja via hidrólise enzimática, resultando um hidrolisado proteico que foi utilizado como fonte de nitrogênio na produção de bioetanol por *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054. A enzima empregada foi a Alcalase, que é uma enzima proteolítica isolada de linhagens selecionadas de *Bacillus licheniformis*, sendo seu maior componente enzimático a subtilisina Carsberg. O processo proposto resultará em um hidrolisado proteico de alta qualidade, não apresentando custo elevado (STENZEL, 2009). Desta forma, pretende-se determinar o efeito do processamento térmico da soja sobre a qualidade da proteína no farelo empregando o método de solubilidade da proteína em hidróxido de potássio, bem como a avaliação da solubilidade desta proteína de farelo de soja em hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho empregando a variação de pH em função da concentração de enzima adicionada ao hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho.

A escolha do farelo de soja, bem como do sabugo de milho como matérias-primas a serem empregadas neste trabalho como fonte de proteína e fonte de carbono, respectivamente, foi devido à grande importância da soja e seus subprodutos na economia brasileira, bem como do grande interesse gerado por processos que envolvam tecnologia de baixo custo energético, com menor impacto ambiental e que utilize matérias-primas renováveis, adequando-se ao reaproveitamento de subprodutos da agroindústria.

2 OBJETIVOS

Geral: Contribuir para o desenvolvimento de uma tecnologia de obtenção de etanol por via biotecnológica, a partir da fração hemicelulósica do sabugo de milho, avaliando a formulação nutricional do meio de fermentação.

Específicos:

- Avaliar a utilização do hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho obtido por hidrólise ácida como substrato para a obtenção de bioetanol por *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054.
- Avaliar a qualidade do farelo de soja em função de seu tratamento térmico.
- Obter a proteína de farelo de soja solubilizada via hidrólise enzimática.
- Avaliar a solubilidade da proteína de farelo de soja obtida por hidrólise enzimática em hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho.
- Avaliar o efeito da suplementação do hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho com a proteína de farelo de soja solubilizada em associação ou não com outros nutrientes (uréia e sulfato de amônia) na obtenção de bioetanol por *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Materiais lignocelulósicos

O Brasil dispõe de grande variedade de resíduos agrícolas e agroindustriais cujo processamento desperta um grande interesse econômico e social. Dentre estes, figuram-se unidades de produção agrícola geradoras de resíduos, de palha de cereais, de milho, de trigo, sabugo de milho, cascas de arroz e de aveia, dentre outros materiais lignocelulósicos (RAMOS, 2000).

Os materiais lignocelulósicos representam uma das fontes de energia renováveis mais abundantes. Seus principais componentes orgânicos são a celulose, a hemicelulose e a lignina. As proporções destes variam de acordo com a espécie vegetal e outros fatores biológicos como diferenças genéticas dentro de uma mesma espécie e condições de crescimento (GOLDSTEIN, 1981; WYMAN, 1999; FENGEL; WEGENER, 1989). A composição aproximada de alguns tipos de matérias lignocelulósicos está apresentada na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Composição aproximada de alguns tipos de materiais lignocelulósicos.

Biomassa Lignocelulósica	% Base Seca		
	Celulose	Hemicelulose	Lignina
Sabugo de milho	32,2	29,0	18,8
Palha de milho	28,3	16,4	23,8
Bagaço de cana	36,6	18,7	22,5
Palha de arroz	38,1	19,9	14,1
Casca de arroz	32,4	13,9	27,8

Fonte: Adaptado (RAJ et al., 2015).

A parte do vegetal que forma a parede celular é chamada estrutura lignocelulósica, a qual é constituída por uma estrutura dura e fibrosa composta basicamente por carboidratos (celulose e hemicelulose), os quais estão ligados a uma estrutura contendo

substâncias aromáticas, denominada lignina. A Figura 3.1 apresenta a estrutura simplificada da fibra de materiais lignocelulósicos.

Figura 3.1: Esquema estrutural simplificado das fibras do material lignocelulósico.

Fonte: Adaptado (TOMME; WARREN; GILKES, 1995).

A celulose é o principal componente da parede celular dos vegetais, desempenhando uma função na estrutura das células. Ela é encontrada na forma de fibras compostas por grande número de microfibras ordenadas paralelamente e ligadas entre si por pontes de hidrogênio. Estruturalmente a celulose é um homopolímero linear de alta massa molar e alta cristalinidade, formada por ligações β -1-4-glicosídica de repetidas unidades de D-glicose (GOLDSTEIN, 1981). A quebra das ligações das unidades de glicose da celulose, por hidrólise ácida ou enzimática, quando realizada completamente, resulta glicose, entretanto, um dos principais obstáculos para sua hidrólise é a sua estrutura altamente cristalina (PARISI, 1989).

A hemicelulose é considerada o segundo complexo orgânico mais abundante, estando presente em todas as camadas da parede celular dos vegetais, mas concentrado principalmente nas camadas primárias e secundárias, associada com a celulose e a lignina (BISARIA; GHOSE, 1981). A Figura 3.2 mostra a estrutura simplificada da hemicelulose.

Figura 3.2: Estrutura química parcial da hemicelulose.

Fonte: Adaptado (FENGEL; WEGENER, 1989).

A hemicelulose apresenta variações quanto à sua composição e estrutura, sendo constituída de polímeros heterogêneos com cadeias lineares, com algumas ramificações laterais. É constituída principalmente por duas pentoses (D-xilose e L-arabinose), por três hexoses (D-glicose, D-manose e D-galactose), além de ácidos D-glucurônicos e grupos acetilas (FENGEL; WEGENER, 1989). Na estrutura da hemicelulose podem ser identificados três grupos de polímeros bem definidos: as xilanas, as mananas e as galactanas. As xilanas são constituídas de moléculas de D-xilose unidas por ligações β-1-4, formando uma fração linear, e por ramificações de L-arabinose, ácidos glucurônico e arabinoglucurônico (KUHAD; SING, 1993). A hemicelulose é mais susceptível à hidrólise que a celulose e a lignina, o que se deve à sua estrutura amorfa e sua menor massa molar (GOLDSTEIN, 1981).

A lignina é o terceiro maior componente da parede celular, sendo um heteropolímero amorfo, formado por três unidades diferentes de fenilpropano (álcool p-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico) com diversos tipos de ligações entre os monômeros, resultando uma estrutura polifenólica complexa a qual não pode ser convertida em açúcar fermentescível. A principal função da lignina é dar suporte estrutural à planta e proteger contra o ataque de micro-organismos e estresse oxidativo (FENGEL; WEGENER, 1989; GOLDSTEIN, 1981).

Além dos três componentes principais, a parede celular da biomassa vegetal apresenta outros constituintes, em menor proporção, que são classificados como extrativos

(ácidos graxos, resinas, taninos, etc.) e não-extrativos (sílica, oxalatos, carbonatos, etc.), que variam suas composições de acordo com cada espécie de material (KUHAD; SINGH, 1993).

Entender as propriedades físicas e químicas da biomassa pode ajudar no uso de tecnologias para o processamento tanto térmico quanto químico desta biomassa (RAJ et al., 2015). Vários grupos de pesquisa têm direcionado seus esforços para o desenvolvimento de estratégias que visam o processamento da biomassa com máxima eficiência na utilização do material *in natura*, proporcionando com isso baixo impacto ambiental e maior rentabilidade econômica (RODRIGUES, 2005). A hidrólise de materiais lignocelulósicos é realizada por processos físicos, químicos, biológicos e pela combinação destes. Dentre estes métodos a hidrólise ácida apresenta uma eficiente separação de açúcares (RODRIGUES, 2005).

A hidrólise ácida é útil na separação e solubilização da fração hemicelulósica e tem pouca ação sobre a lignina e a celulose. Este método pode ser realizado em uma única etapa em temperaturas apropriadas (BINOD et al., 2010). Essa característica do processo permite a obtenção de hidrolisados com alto conteúdo de xilose em relação a outros glicídios. Durante a hidrólise ácida, os catalisadores liberam prótons que clivam as ligações heterocíclicas de éter entre os monômeros das cadeias poliméricas da hemicelulose e, no caso de ácidos concentrados, da celulose. Com a clivagem dos polímeros são liberadas diversas substâncias, sendo majoritária a presença de xilose, glicose e arabinose (AGUILAR et al., 2002; SUN; CHENG, 2002; CUZENS; MILLER, 1997; RODRÍGUEZ-CHONG et al., 2004).

Entretanto, nesse processo são liberados não somente açúcares solúveis da fração hemicelulósica, como também produtos de degradação, os quais dependem do tipo e das condições do tratamento de hidrólise, o que envolve condições de concentração do ácido, alta temperatura e pressão. Estes compostos de degradação são tóxicos aos micro-organismos que realizam a fermentação dos açúcares liberados em etanol, por isso é necessária a escolha adequada das condições do processo (ZALDIVAR; MARTINEZ; INGRAM, 2000; ROBERTO; MUSSATTO; RODRIGUES, 2003; KELLY et al., 2008). Entre estes compostos inibidores, estão o furfural e o hidroximetilfurfural, originados da desidratação de pentoses e hexoses, respectivamente, o ácido acético, liberado pela hidrólise de acetil-xilanas, bem como compostos aromáticos derivados da lignina (ZALDIVAR; MARTINEZ; INGRAM, 2000).

A presença das substâncias inibidoras nos hidrolisados hemicelulósicos normalmente impõe a necessidade de purificação dos hidrolisados antes da utilização e/ou adaptação dos micro-organismos ao açúcar a ser utilizado (WINKELHAUSEN; KUZMANOVA, 1998). Diferentes métodos de destoxificação podem ser aplicados, e na maioria dos casos estes inibidores são parcialmente removidos (OLSSON; HAHNHÄGERDAL, 1996) ou transformados em compostos inativos (PARAJÓ et al., 1998). Na etapa de destoxificação, uma variedade de tratamentos físico-químicos e também tratamentos biológicos pode ser utilizada (PALMQVIST; HAHNHÄGERDAL, 2000). Já foram propostas como estratégias de destoxificação, conduzidas tanto de forma individual quanto combinadas, os métodos de neutralização, adsorção por resinas de troca iônica, adsorção por carvão ativado e *overliming* com hidróxido de cálcio (CHANG et al., 1998; PALMQVIST; HAHNHÄGERDAL, 2000; CHANG, V. et al., 2001; CHANDEL et al., 2007; CANILHA et al., 2010). Dentre as metodologias apresentadas, a técnica de *overliming* é considerada a técnica mais amplamente utilizada (OLSSON; HAHNHÄGERDAL, 1996; ALVES, 1997; MARTINEZ et al., 2000) e tem sido efetiva como um processo de destoxificação devido à remoção parcial de inibidores tóxicos, como furfural e hidroximetilfurfural, ainda que este mecanismo não seja ainda completamente bem compreendido (CARDONA et al., 2010).

Durante o *overliming*, o ácido sulfúrico é removido do hidrolisado pela adição de hidróxido de cálcio (ou outro hidróxido), resultando um ajuste do pH, condição sob a qual um precipitado é formado (DU PREEZ, 1994; ROBERTO et al., 1994). Além disso, a técnica de *overliming* causa outros efeitos benéficos, incluindo a remoção de compostos fenólicos, precipitação de íons de metais pesados e conversão do furfural em ácido furfurílico (PARAJÓ et al., 1998). Entretanto, já foi observado que as concentrações de ácido acético antes e depois deste tratamento não foram alteradas significativamente (KARIMI et al., 2006). Um método que pode ser utilizado em conjunto com a técnica de *overliming* para a diminuição da concentração de ácido acético em hidrolisados é a adsorção por carvão ativado, capaz de contribuir também para a diminuição das concentrações de derivados fenólicos (PARAJÓ et al., 1998; CARDONA et al., 2010).

3.2. Sabugo de milho

O sabugo de milho é um resíduo agrícola sólido de grande volume que resulta do processamento do milho. O milho pertence à família das poáceas (antigo grupo das gramíneas). É uma espécie anual, estival, cespitosa, ereta, com baixo afilamento, e com ampla adaptação a diferentes condições de ambiente. Esse cereal é largamente cultivado no mundo e é utilizado na alimentação humana e animal, principalmente devido às suas propriedades nutricionais (PERRY et al., 2006). A produção mundial do milho chegou a mais de 800 milhões de toneladas em 2009. Os Estados Unidos respondem por mais de 50% da produção mundial. Outros grandes produtores são China, Índia, Brasil, França, Indonésia e a África do Sul (FAO, 2008). Segundo dados da CONAB (Companhia Nacional de Abastecimento) a safra 2007/08 de milho nacional alcançou uma produção de mais de 400 milhões de toneladas. Diante de boas perspectivas de rentabilidade aliada ao clima favorável, ao desenvolvimento e maiores investimentos em tecnologia, a produtividade média nesta safra foi de 4.134 kg/ha.

Em qualquer cultivo de plantas é inevitável o aparecimento de resíduos, que são constituídos por cascas, caroços, sementes, ramas, bagaços e outros. O sabugo de milho entra na categoria de resíduos da agricultura que ainda não teve o seu potencial totalmente explorado. Para cada 100 kg de espigas de milho, aproximadamente 18 kg são formados pelo sabugo de milho. A produção mundial de sabugo de milho foi cerca de 144 milhões de toneladas em 2008, sendo que no Brasil esse valor chega a quase 8 milhões de toneladas neste mesmo ano. Apesar da grande quantidade gerada desse subproduto, a variedade de utilização ainda não se mostra compatível com seu potencial de uso (SULTANA; ANWAR; PRZYBYLSKI, 2007). O componente majoritário do sabugo de milho é a xilana. A estrutura química parcial das xilanas de gramíneas está representada na Figura 3.3.

Figura 3.3: Representação esquemática da estrutura química parcial de xilana de gramíneas.

Fonte: Adaptado (PULS; SCHUSEIL, 1993).

Na indústria, desde a década de 80, o sabugo apresenta grande utilidade para a produção de vários produtos químicos, como o plástico, as colas adesivas, os compostos de borracha e pneus. Devido ao fato de ser inerte. Devido à sua dureza e resistência, o sabugo é utilizado também como abrasivo e polidor em produtos de limpeza, fabricação de tijolos e cerâmicas. Ainda no âmbito industrial, uma das utilizações do sabugo de milho é a produção do composto químico furfural (FOLEY; VANDER-HOOVEN, 1981). Outras utilidades foram designadas ao sabugo, sendo utilizado como aditivo em óleos vegetais (ANWAR; BHANGER; YASMEEN, 2003). A utilização do sabugo de milho para produção de etanol no início do século XXI foi marcada por grandes investimentos na produção de celulases, especialmente focada para sua aplicação na obtenção de etanol combustível. Em 2000, o US DOE (*United States Department of Energy*) iniciou parcerias para acelerar o desenvolvimento tecnológico e tornar viável economicamente a produção de etanol a partir de resíduos do milho (sabugo, palha e bráctea).

3.3. Etanol combustível

No Brasil, o uso de etanol como combustível é destaque mundial pelo pioneirismo e pelos volumes produzidos e consumidos no país. O incentivo à utilização do etanol como combustível no Brasil ganhou destaque nos anos 70 com a implementação do programa Proálcool pelo governo, em 1975. Um dos principais objetivos do programa ocorreu pelo

aumento no preço do petróleo devido à crise mundial de abastecimento. Assim, o governo estabeleceu a prática de adição de 5% de etanol à gasolina, o que incentivou o setor canavieiro no Brasil e promoveu a otimização do processo de produção de álcool por meio de pesquisa e desenvolvimento (GOLDEMBERG; NIGRO; COELHO, 2008; MATSUOKA; FERRO; ARRUDA, 2009). Além disso, o Proálcool impulsionou o desenvolvimento dos motores de automóveis para a utilização do etanol como combustível e dos motores do tipo *flex-fuel*, utilizados para qualquer mistura etanol-gasolina (MOUSDALE, 2008). Este novo tipo de motor, lançado no Brasil em maio de 2003, fez do país uma referência mundial (CORREIA, 2005).

Atualmente o governo brasileiro anunciou que irá aumentar a porcentagem de etanol na gasolina com a Medida Provisória, N° 647 de 2014. Com este aumento de 1% a 2% haverá um incentivo ainda maior para a produção de etanol no país, o que, segundo o senador Waldemir Moka representará um aumento de aproximadamente 1,2 bilhão de litros de álcool anidro (NOVACANA, 2014; SERERP, 2014).

Além das questões econômicas que envolvem a substituição da gasolina pelo etanol ou o uso de ambos, existem ainda as preocupações ambientais. As emissões anuais de CO₂ provenientes da queima de combustíveis cresceram, saindo de um valor próximo de zero para atingir os 31,6 bilhões de toneladas em 2012. Entre as atividades humanas produtoras de gases causadores do efeito estufa, o uso de energia é a mais expressiva, correspondendo a mais de 80% destas emissões (IEA, 2014). A mistura do etanol à gasolina é uma prática comum em países como EUA e Brasil, a qual apresenta três benefícios principais: redução na utilização da gasolina, aumento da octanagem da gasolina e aumento do oxigênio na mistura, o que resulta uma combustão mais eficiente e a diminuição das emissões de dióxido de carbono (WYMAN, 1994; PRASAD; SINGH; JOSHI, 2007). Além disso, a utilização do etanol como combustível permite a reciclagem do dióxido de carbono produzido durante a combustão por meio de processos fotossintéticos, o que significa que não há aumento líquido na taxa desse gás causador de efeito estufa na atmosfera (ZALDIVAR; NIELSEN; OLSSON, 2001).

3.4. Etanol de primeira e segunda geração

De acordo com as matérias-primas empregadas, o etanol pode ser classificado em primeira ou segunda geração. O etanol produzido a partir de matérias-primas açucaradas e/ou amiláceas é denominado etanol de primeira geração. A segunda geração do álcool utiliza como matérias-primas os materiais lignocelulósicos, constituídos em sua maioria por polissacarídeos tais como a celulose e a hemicelulose (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

Os Estados Unidos são os maiores produtores de etanol de primeira geração e, juntamente com o Brasil, respondem por mais da metade da produção mundial (KOHLHEPP, 2010). Uma produção alternativa que vem sendo estudada é a obtenção de etanol a partir de materiais lignocelulósicos. Estas matérias primas são mais complexas e os custos de produção ainda são elevados quando comparados aos processos de primeira geração (ZALDIVAR; NIELSEN; OLSSON, 2001). O Brasil aparece no cenário mundial como o segundo maior produtor de etanol de primeira geração, sendo considerado o líder internacional em matéria de combustível alternativo e o primeiro em ter atingido seu uso sustentável (KOHLHEPP, 2010). Estima-se que cerca de 442 milhões de litros de etanol podem ser produzidos a partir da biomassa lignocelulósica gerada e ainda que, resíduos agrícolas desperdiçados poderiam gerar cerca de 491 milhões de litros de etanol por ano (KIM; DALE, 2004).

A primeira usina de etanol celulósico em escala comercial do País foi inaugurada em 2014 em Alagoas, a qual representa um grande avanço para o Brasil porque o coloca entre os países que já tem planos concretos de utilização dessa tecnologia (ÚNICA, 2014). Para acelerar o desenvolvimento em escala comercial do etanol de segunda geração, produzido a partir da palha e do bagaço da cana-de-açúcar, o Banco Nacional do Desenvolvimento Econômico e Social (BNDES) vai investir R\$ 600 milhões na usina pioneira da GranBio, que terá capacidade para produzir 82 milhões de litros/ano. O Banco abriu uma linha de crédito em 2012, que vem sendo utilizada por diversas empresas ativas no desenvolvimento de tecnologias para a produção de biocombustíveis de segunda geração, como Abengoa e DuPont (ÚNICA, 2014).

Embora em fase inicial de implantação, o etanol celulósico apresenta grande potencial de crescimento, pois não compete com a produção de alimentos para sua industrialização e nem da expansão da área plantada com cana-de-açúcar, e sim do reaproveitamento dos resíduos da produção de etanol e açúcar, que já são abundantes. Um

dos principais desafios para o Brasil está na busca pela competitividade do combustível de segunda geração em relação ao de primeira. Acredita-se que até 2020, outras empresas começarão a utilizar essas tecnologias, provocando um volume crescente de produção de combustível de segunda geração (ÚNICA, 2014). O grande desafio atual na produção de etanol combustível é a utilização destas matérias-primas lignocelulósicas, uma vez que estes materiais são subprodutos das atividades agrícolas e/ou resíduos industriais, apresentando assim caráter renovável e de baixo custo econômico, e, portanto, de grande potencial para a produção de etanol combustível em larga escala (MOUSDALE, 2008).

3.5. Obtenção de etanol por via biotecnológica

O etanol pode ser obtido a partir de processos químicos ou biotecnológicos. A via química de produção de etanol ocorre pela hidratação do etileno em meio ácido por meio de uma catálise sólido líquido (SOLOMONS; FRYHLE, 2005). Um dos inconvenientes da síntese química é a utilização de altas pressões, requeridas ao equilíbrio químico do processo, além dos problemas de corrosão dos equipamentos em função da presença do ácido (ISHIHARA et al., 1997).

Os principais processos de produção biotecnológica de etanol podem ser divididos em três etapas: a primeira etapa é de pré-tratamento da matéria-prima com a finalidade de obter os açúcares fermentescíveis, a segunda etapa é de bioconversão dos açúcares em etanol e a terceira etapa de separação e purificação do álcool, usualmente por destilação (SILVA et al., 2010).

A produção biotecnológica de etanol de primeira geração é responsável pela maior parte do álcool produzido em todo o mundo, para a qual se utilizam leveduras como catalisadores do processo, por meio da fermentação direta de carboidratos simples. As principais matérias-primas são aquelas constituídas de sacarose ou amido que podem ser convertidos a etanol pela ação dos micro-organismos fermentadores (ZALDIVAR; NIELSEN; OLSSON, 2001; FESTEL, 2008; CARDONA; SÁNCHEZ; GUTIÉRREZ, 2010). No Brasil, o melaço extraído da cana-de-açúcar é a principal matéria-prima empregada para a produção de etanol de primeira geração, sendo a levedura *Saccharomyces cerevisiae* o principal micro-organismo usado nesta bioconversão. Estes bioprocessos são comumente realizados por fermentação descontínua alimentada ou por fermentação contínua, com reciclo de fermento em ambos os casos (BASTOS, 2007). Por

outro lado, nos Estados Unidos a principal matéria-prima empregada na produção do álcool é o amido proveniente do milho (LIMA; BASSO; AMORIM, 2001).

Com relação à produção biotecnológica de etanol de segunda geração, que emprega materiais lignocelulósicos que apresentam estrutura mais complexa, se fazem necessárias etapas adicionais de pré-tratamento para promover a liberação dos açúcares fermentescíveis, pela quebra parcial ou total da hemicelulose, e aumentar assim a suscetibilidade da celulose para posterior liberação de D-glicose por hidrólise enzimática (GÍRIO et al., 2010; SILVA et al., 2010). As pentoses contidas na fração hemicelulósica podem ser fermentadas ou assimiladas por leveduras selvagens, como por exemplo, do gênero *Candida* e *Scheffersomyces* (CHANDEL et al., 2007; SILVA; CARNEIRO; ROBERTO, 2013), ou cepas geneticamente modificadas (MATSUSHIKA et al., 2009), enquanto que para a fermentação das hexoses são empregadas leveduras convencionalmente utilizadas na produção de etanol de primeira geração, como *Saccharomyces cerevisiae* (BASTOS, 2007).

3.5.1 Obtenção de etanol a partir de hidrolisado hemicelulósico

A hemicelulose compõe-se principalmente de xilose, que possui diversas aplicações industriais. Assim, para o uso deste açúcar para a produção de etanol por via biotecnológica é necessário conhecer o processo de transformação deste açúcar em etanol pelo metabolismo fermentativo. A D-xilose é o segundo carboidrato mais abundante na natureza, encontrada predominantemente na fração hemicelulósica de diversos tipos de biomassa vegetal. Em virtude deste fato, a obtenção de etanol de segunda geração dependerá em grande parte da eficiente fermentação desta fração (VAN VLEET; JEFFRIES, 2009).

A conversão estequiométrica de xilose em etanol é demonstrada na equação (3.1), em que, para cada 3 moles de xilose produz-se o máximo de 5 moles de etanol, acompanhado do desprendimento de igual número de moles de CO₂. Em outras palavras, o rendimento teórico do processo é de 0,511 g de etanol por cada 1,00 g de xilose. O rendimento teórico é de 1,67 mol etanol/mol D-xilose, ou 0,511 g_{etanol}/g_{D-xilose} (HAHN-HÄGERDAL et al., 2007). Na realidade, este rendimento não pode ser alcançado porque parte do substrato é desviada para o crescimento e manutenção das células e para formação de outros subprodutos como ácidos orgânicos e glicerol, intrínsecos ao metabolismo.

O metabolismo de D-xilose apresenta-se de forma distinta entre bactérias e leveduras e até mesmo entre diferentes espécies de leveduras (AGBOGBO; COWARD-KELLY, 2008). As bactérias que assimilam xilose possuem a enzima xilose isomerase que é capaz de converter D-xilose em D-xilulose, que posteriormente é fosforilada pela enzima xilulose quinase, em D-xilulose-5-fosfato, um intermediário comum no metabolismo de células eucarióticas e procarióticas (MOHAGHEGHI et al., 2002; DIEN et al., 2003; HÄHN-HÄGERDAL et al., 2007).

As leveduras produtoras de etanol a partir de D-xilose incluem principalmente as espécies *Scheffersomyces stipitis*, *Candida shehatae*, *C. lignosa*, *Pachysolen tannophilus* (AGBOGBO; COWARD-KELLY, 2008) e *Spathaspora passalidarum* (NGUYEN et al., 2006).

No caso de leveduras, a primeira reação do metabolismo da D-xilose (Figura 2.4) é a redução da D-xilose em xilitol, catalisada por xilose redutase (XR), dependente de coenzimas NADPH ou NADH, segundo a linhagem. O xilitol pode ser posteriormente, oxidado a D-xilulose pela ação da xilitol desidrogenase (XDH), que requer a coenzima NAD^+ . O composto formado pode então ser excretado da célula, ou ainda oxidado em D-xilulose, pela enzima XDH, a qual é dependente de NAD^+ (SLININGER; BOTHAST, 1990). Uma vez convertida em D-xilulose, o metabolismo continua com a fosforilação até D-xilulose-5-fosfato, que é catalisada pela xilulose quinase com o consumo de ATP. Pela via Embden Meyerhof Parnas (EMP), o gliceraldeído-3-fosfato e a frutose-6-fosfato são convertidos em piruvato, com geração de NADPH necessário em outras etapas metabólicas (JEFFRIES, 1985).

O piruvato por sua vez, pode ser oxidado no ciclo dos ácidos tricarboxílicos, recuperando as coenzimas na cadeia respiratória, ou ser fermentado em etanol, pela ação das enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase, sendo, neste processo, reoxidado o NADH resultante da oxidação do gliceraldeído-3-fosfato (JEFFRIES, 1985).

Sob condições de anaerobiose estrita ou de limitação de oxigênio, algumas leveduras degradadoras de D-xilose, com XR dependente tanto de NADH como de NADPH, podem regenerar o NAD^+ consumido na segunda reação do metabolismo. Esta dupla

especificidade permite balancear o potencial redox em NAD^+/NADH da XDH alterado pelo bloqueio da cadeia respiratória devido à ausência de oxigênio (BRITO, 2000; BRÜINENBERG et al., 1984; JEFFRIES, 2007).

Figura 3.4: Metabolismo de D-xilose em leveduras.

Fonte: Adaptado (HÄHN-HÄGERDAL et al., 1994).

3.5.1.1. Fatores que influenciam a produção de etanol por *Scheffersomyces stipitis*

A levedura *Scheffersomyces stipitis* tem sido reportada como uma das espécies selvagens mais eficientes para a bioconversão de D-xilose, por apresentar características únicas que permitem minimizar a produção de xilitol, favorecendo desta forma a produção de etanol (AGBOGBO; COWARD-KELLY, 2008). Nesta espécie de levedura, a enzima xilose redutase apresenta afinidade tanto pelo cofator NADPH quanto pelo NADH. Em condições de baixa aeração, o balanço total de cofatores quando NADH é utilizado preferencialmente em relação ao NADPH permite a produção de etanol em detrimento do xilitol. Além disso, esta levedura apresenta um sistema oxidativo complexo na mitocôndria, o qual possui duas vias diferentes de transporte de elétrons, a cadeia tradicional de transporte via citocromo-C e uma via alternativa que utiliza o ácido salicilhidroxâmico, proporcionando um maior controle do potencial redox (JEFFRIES, 1983).

O desempenho fermentativo de *Scheffersomyces stipitis* tem sido amplamente avaliado em meio semissintético e em hidrolisados hemicelulósicos de biomassa vegetal. A melhor fermentabilidade destes meios dependerá das condições empregadas, tais como temperatura, pH, aeração, concentração inicial de substrato e suplementação, bem como da cepa avaliada (SILVA; MUSSATTO; ROBERTO, 2010). O suplemento de oxigênio é um dos mais importantes fatores ambientais na fermentação de D-xilose por *Scheffersomyces stipitis*, podendo afetar drasticamente a produtividade volumétrica em etanol e o rendimento, bem como o acúmulo de subprodutos, como o xilitol. De acordo com Bruinenberg et al. (1984), a fermentação de D-xilose é mais eficiente quando cultivada a levedura em condições limitadas de oxigênio.

De acordo com a literatura, a temperatura ótima para a produção de etanol por *Scheffersomyces stipitis* em meio semissintético encontra-se entre 25 e 33 °C (DU PREEZ; BOSH; PRIOR, 1986; SLININGER; BOTHAST, 1990). O efeito do pH sobre a fermentabilidade de diferentes meios por *Scheffersomyces stipitis*, incluindo hidrolisados hemicelulósicos, também tem sido amplamente estudado de forma a maximizar a produção de etanol pela levedura. du Preez, Bosh e Prior (1986) reportaram que os parâmetros fermentativos obtidos durante o cultivo de *Scheffersomyces stipitis* CSIR-Y633 em meio semissintético contendo 50 g/L de D-xilose foram fortemente afetados pelo pH inicial do meio (entre 2,5 e 6,5). Os valores mais elevados de produtividade volumétrica em etanol

foram favorecidos na faixa de pH de 4,0 a 5,5, com uma queda de 12% no parâmetro quando cultivada a levedura em pH inicial de 6,5.

De acordo com a literatura, a concentração dos ácidos alifáticos fracos não dissociados (forma tóxica) presentes em hidrolisados hemicelulósicos é inteiramente dependente do pH inicial do meio, uma vez que estes compostos podem facilmente difundir para o interior da célula através da membrana plasmática, inibindo assim o crescimento e a produção de etanol pela levedura. Desta forma, o efeito inibitório dos ácidos alifáticos na fermentação de hidrolisados hemicelulósicos pode ser minimizado pela manutenção do pH (LOHMEIER-VOGEL; SOPHER; LEE, 1998). Um importante aspecto ainda a ser considerado na produção de etanol a partir de D-xilose é o efeito da concentração inicial do substrato e dos nutrientes nestes meios fermentativos.

A bioconversão de D-xilose em etanol por *Scheffersomyces stipitis* também é influenciada pela concentração inicial de substrato do meio fermentativo. Roberto et al. (1991), estudando a produção de etanol por *Scheffersomyces stipitis* CBS 5773 a partir de meio semissintético contendo diferentes concentrações de D-xilose (20 a 145 g/L), observaram que a produção do álcool não foi afetada ($Y_{P/S} = 0,38$ g/g) em concentrações inferiores a 145 g/L. Entretanto, quando cultivada em meio contendo 145 g/L de D-xilose, os autores observaram uma redução na conversão de substrato em etanol de aproximadamente 30%, mostrando que a partir de concentrações elevadas deste açúcar pode ocorrer redução da concentração final de produto.

A concentração inicial de D-xilose também tem sido avaliada em hidrolisados hemicelulósicos, uma vez que a viabilidade econômica na etapa de destilação do etanol só é possível se concentrações superiores a 40 g/L do álcool forem alcançadas, tornando assim imprescindível o emprego de altas concentrações de açúcares fermentescíveis (GÍRIO et al., 2010). De fato, além dos parâmetros ambientais e nutricionais acima citados, outros fatores podem afetar a bioconversão de D-xilose em etanol por *Scheffersomyces stipitis*, quando cultivada a levedura em hidrolisados hemicelulósicos. Estes fatores estão diretamente ligados à complexidade química destes hidrolisados, incluindo os compostos potencialmente tóxicos ao metabolismo fermentativo, os quais são liberados durante o processo de hidrólise ácida dos materiais lignocelulósicos, tais como os ácidos alifáticos, furanos e compostos fenólicos de baixa massa molar (MUSSATTO; ROBERTO, 2004).

3.5.1.2. Composição nutricional do meio de fermentação e fontes de Nitrogênio

A produtividade de qualquer processo de bioconversão é influenciada pelos parâmetros ambientais do processo e pela composição do meio de fermentação, (SUNITHA; LEE; OH, 1999). Sendo assim, a otimização da composição do meio de cultura é uma maneira em potencial de aumentar a produtividade de um processo (PHAM et al., 1998). Além disto, o estabelecimento das condições de fermentação e composição do meio é de crucial importância para o desenvolvimento de um processo eficiente de produção de etanol (RATMAN et al., 2005). Em geral, fontes de nitrogênio e vários sais minerais têm sido utilizados na suplementação nutricional de hidrolisados hemicelulósicos para a produção de etanol (NIGAM, 2002; MIYAFUJI et al., 2003). Entretanto, quando hidrolisados hemicelulósicos são utilizados como meio de cultura, a necessidade de suplementação pode ser minimizada, desde que eles contenham, além do substrato, componentes que são essenciais para o crescimento das células (PREZIOSI-BELLO; NOLLEAU; NAVARRO, 2000). Levando em conta que o custo do meio de cultura é um fator muitas vezes decisivo em processos de bioconversão, é muito importante definir a necessidade mínima da suplementação nutricional para a bioconversão do hidrolisado (MUSSATO; ROBERTO, 2005).

Em geral, fontes de nitrogênio e sais minerais têm sido utilizadas na suplementação de hidrolisados hemicelulósicos visando melhorar a fermentabilidade destes meios (EKEN-SARAÇOGLU; ARSLAN, 2000; SILVA, 2007).

Slininger et al. (2006) estudaram a influência da fonte de nitrogênio e de minerais sobre a produção de etanol a partir de xilose pela levedura *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124. Os autores verificaram que o nutriente $MgSO_4$ teve grande influência sobre o crescimento celular e sobre o acúmulo de etanol e que na ausência de uma fonte de nitrogênio não foi observada produção de etanol. Aminoácidos utilizados como única fonte de nitrogênio mostraram-se suficientes para manter o crescimento celular assim como uma produção elevada de etanol. Entretanto, quando ureia foi utilizada como única fonte de nitrogênio, a produtividade de biomassa e etanol permaneceu próxima a zero, mesmo quando minerais foram adicionados. A adição de aminoácidos melhorou a produtividade em etanol, sendo estes mais que uma fonte simples de amino-nitrogênio ($-NH_2$), pois quando ureia foi utilizada como única fonte de nitrogênio, o acúmulo de etanol foi a metade do observado para o meio mantido apenas com aminoácidos. Entretanto, a

otimização da fonte de nitrogênio mostrou que os melhores resultados de produtividade e acúmulo de etanol foram obtidos quando empregado como fonte de nitrogênio uma proporção de 80% de ureia e 20% de aminoácidos (de um total de 0,15 M de nitrogênio).

Diferentes fontes de nitrogênio e outros nutrientes podem ser empregados na suplementação de meios de cultura para fermentação de pentoses. Amartey e Jeffries (1994) compararam diferentes fontes de nitrogênio e outros nutrientes, tais como: extrato de malte, extrato de levedura, peptona, sais (MgSO_4 e KH_2SO_4) e CSL (*Com Steep Liquor*, um subproduto do beneficiamento de amido de milho) para a bioconversão de xilose em etanol por *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054. Os autores observaram que os melhores resultados obtidos em crescimento celular e produção de etanol foram para os meios contendo CSL, mesmo quando utilizado como única fonte de nutrientes. Os autores concluíram que CSL pode ser usado como uma fonte de baixo custo de nitrogênio e outros nutrientes para fermentação de xilose por *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054.

Em geral, a otimização da composição de meios de fermentação é realizada por meio de método tradicional no qual se estuda uma única variável por vez, fixando as demais variáveis em um determinado nível. Este método além de consumir tempo é ineficiente em muitos casos, pois não permite completo entendimento do sistema observado (MANTHA; BASHA; PANDA, 1998; PHAM et al., 1998). A metodologia estatística de planejamento fatorial vem sendo amplamente empregada na avaliação dos efeitos das variáveis e na otimização de parâmetros de composição de meios de fermentação (SUNITHA; RAO; AVYANNA, 1998; RAO; KIM; RHEE, 2000; PINTADO; GONZÁLEZ; MURADO, 1997). Esta metodologia possibilita o estudo de diversas variáveis com redução no número de experimentos, e ainda permite verificar os efeitos individuais dos fatores e suas interações (ROBERTO et al., 1995; SUNITHA; LEE; OH, 1999; LIU; TZENG, 1998).

3.6. Farelo de soja: fonte de nitrogênio alternativa

Como fonte alternativa de nitrogênio encontra-se o farelo de soja, devido ao seu alto teor de proteína e por sua disponibilidade como subproduto da indústria de extração de óleo de soja. A soja, originária da China, pertence à família *Leguminosae* e ao gênero *Glycine*, que compreende cerca de 15 espécies, sendo a comercial a *Glycine max*. Os grãos de soja são duros, geralmente amarelos e tem formato semelhante ao de uma ervilha. É um dos mais antigos vegetais usados na alimentação do homem (SIMONETTI, 1999). Uma das principais características da soja como alimento é o seu alto teor de proteínas. A proteína dos alimentos fragmenta-se em aminoácido durante o processo de digestão (SIMONETTI, 1999).

O processamento da soja dá origem a diferentes matérias-primas como farinhas de soja, extratos hidrossolúveis e proteínas texturizadas que podem ser utilizados na produção de alimentos que fazem parte da dieta (GENOVESE; LAJOLO, 2002). A soja é um alimento rico em proteínas, fibra, óleo e importante fonte de minerais (sódio, potássio, fósforo, ferro, magnésio, zinco e cálcio) e vitaminas como tiamina (B1), riboflavina (B2), niacina (B3), ácido nicotínico e ácido ascórbico (BAZINET et al., 1997). As principais propriedades funcionais da proteína de soja são: capacidade de retenção de água, emulsificação, gelatinização e formação de espuma (GARCIA et al., 1997).

Segundo as primeiras estimativas divulgadas pelo USDA, os Estados Unidos serão os maiores produtores mundiais de soja em 2014/15. Os agricultores americanos serão responsáveis por produzir 107,7 milhões de toneladas. O Brasil deverá produzir 94 milhões de toneladas, seguido pela Argentina com 55 milhões e da China com aproximadamente 11,8 milhões de toneladas (SEAB, 2015). Com relação à produção nacional, o total estimado para a safra 2014/15 será cerca de 3,7% superior ao do ano anterior. Os maiores estados produtores no Brasil, segundo a CONAB, serão o Mato Grosso, que responderá por 27,89 milhões de toneladas, o Paraná, com 14,70 milhões de toneladas, o Rio Grande do Sul com 11,85 milhões de toneladas e Goiás, que produzirá 9,87 milhões de toneladas (SEAB, 2015).

No país, a soja é predominantemente utilizada para o processamento do grão em óleo e proteína. O coproduto desse processo é o farelo de soja com alto teor proteico. Esta proteína processada (torta ou farelo) é utilizada como suplemento proteico na ração animal. Esse farelo é torrado/aquecido ao ponto de inativar os fatores antinutricionais naturalmente presentes na soja (DALL'AGNOL, 2007). Os fatores antinutricionais mais destacados são

os inibidores de proteases, as lectinas, proteínas alergênicas e as saponinas (DALL'AGNOL, 2007).

A Figura 3.5 apresenta um fluxograma do processo de produção do farelo de soja (AVICULTURA INDUSTRIAL, 2014) que será explicado a seguir:

Os grãos colhidos nos campos de produção ou armazenados nos centros de distribuição são transportados até as indústrias de beneficiamento. A pré-limpeza é realizada por máquinas especiais, dotadas de peneiras vibratórias ou de outro dispositivo, que separam os grãos dos contaminantes maiores. Os grãos limpos, dos quais se deseja separar os cotilédones (polpas) dos tegumentos (cascas), não devem sofrer compressão durante o descascamento, pois nesse caso, parte do óleo passaria para a casca e se perderia, uma vez que as cascas, normalmente, são queimadas nas caldeiras destinadas à geração de calor ou vapor nas indústrias (EMBRAPA, 2008).

A extrusão do grão de soja é o processo principal de obtenção do óleo, ela envolve cozimento sob pressão, umidade, alta temperatura e fricção (AVICULTURA INDUSTRIAL, 2014). O processo de extrusão pode levar de 120 a 130 segundos e alcançar temperaturas de 120 a 165 °C dependendo do tipo de extrusor empregado no processo. O aumento da umidade dos flocos, o rompimento das paredes celulares e o subsequente aumento na permeabilidade das membranas celulares, facilita a saída do óleo, diminuindo sua viscosidade e sua tensão superficial, o que permite a aglomeração das gotículas de óleo e sua subsequente extração.

O cozimento coagula e desnatura parcialmente as proteínas e inativa as enzimas lipolíticas, o que diminui a produção de ácidos graxos livres e o conteúdo de compostos de enxofre. O cozimento também diminui a afinidade do óleo pelas partículas sólidas do grão. Os flocos são submetidos à secagem (EMBRAPA, 2008). Após o processo de extrusão da soja, tem-se o farelo integral (com todo o óleo). Para extrair parte do óleo existente, o farelo integral obtido da extrusora segue para a prensa. Normalmente a prensa do tipo parafuso contínuo retira aproximadamente 11 a 15% do óleo presente, o que deixa o farelo com 7 a 9% de óleo (AVICULTURA INDUSTRIAL, 2014).

A prensa é constituída de um cesto de barras de aço retangulares, distanciadas por lâminas. O espaçamento das barras é regulado para permitir a saída do óleo e ao mesmo tempo filtrar os resíduos da prensagem (AVICULTURA INDUSTRIAL, 2014). Dentro do cesto uma rosca movimenta e comprime o material simultaneamente, e a pressão é controlada por um cone de saída. Este farelo prensado (torta) é o farelo semi-integral,

farelo gordo ou farelo rico. Após sair da prensa, esta torta em forma de tabletes está a uma temperatura aproximada de 70 °C, sendo necessário o resfriamento (AVICULTURA INDUSTRIAL, 2014). Esta torta segue para o processo de resfriamento, o que deixa este farelo com a temperatura aproximada da temperatura ambiente. Depois de resfriado, o farelo deve ser moído. Após a moagem do farelo, este segue por transportadores para os silos de armazenagem e/ou expedição (AVICULTURA INDUSTRIAL, 2014). O produto final armazenado não deve ultrapassar 12% de umidade (EMBRAPA, 2008).

Figura 3.5: Fluxograma do processo de produção do farelo de soja.

Fonte: Adaptado (AVICULTURA INDUSTRIAL, 2014).

Após o processamento térmico, a soja e o farelo precisam passar por controle de qualidade para verificar se houve destruição adequada dos fatores antinutricionais. O maior desafio é saber qual a quantidade exata de calor necessária para garantir maior qualidade nutricional desses ingredientes (BRITO et al., 2006), visto que quantidade de calor insuficiente não elimina adequadamente os fatores antinutricionais, e o superaquecimento

pode resultar destruição de alguns aminoácidos. Dentre os métodos de controle de qualidade mais utilizados destacam-se o índice de atividade de urease e a solubilidade da proteína em KOH 0,2% (BRITO et al.,2006). O primeiro é usado como indicador indireto da presença de fatores antinutricionais e indica processamento inadequado (subaquecimento) e o segundo, superaquecimento. O princípio do método da atividade de urease é baseado na destruição da enzima urease nas mesmas condições que os inibidores de proteases e lectinas, considerando como valores ideais de 0,05 a 0,30 (Tabela 3.2), enquanto que, para a solubilidade da proteína em KOH 0,2%, está baseado na reação dos grupos amino livres com outros grupos para formar pontes peptídicas, que reduzem a solubilidade da proteína.

A soja crua possui solubilidade de 100% e, com o aquecimento, a solubilidade diminui, de forma que a solubilidade abaixo de 75% evidencia superaquecimento, sendo o valor ideal maior que 75% e menor que 85% (Tabela 3.3).

Tabela 3.2: Padrão de atividade de urease da soja e do farelo.

Classificação	Atividade Urease
Excelente	0,01 – 0,05
Boa	0,05 – 0,30
Regular	0,21 – 0,31
Deficiente	> 0,30

Fonte: Adaptado (Compêndio de Alimentação Animal, 2005).

Tabela 3.3: Padrão da solubilidade da proteína em KOH na soja e farelo.

Classificação	Solubilidade em KOH
Excelente	> 85%
Boa	> 80%
Razóavel	> 75%
Deficiente	<75%

Fonte: Adaptado (Compêndio de Alimentação Animal, 2005).

Embora a maior parte do farelo de soja ainda seja destinada a rações animais, muitos processos têm sido desenvolvidos com o objetivo de obter produtos mais refinados, destinados diretamente ao consumo humano ou à produção de ingredientes proteicos

(aditivos alimentares) (STENZEL, 2007). As proteínas podem ser quebradas em peptídeos de diferentes tamanhos moleculares e aminoácidos livres, como resultado da clivagem de ligações peptídicas. Esta degradação, chamada hidrólise, pode ser realizada por enzimas, ácidos ou álcalis (CLEMENTE, 2000). O valor nutricional dos produtos hidrolisados está diretamente relacionado à natureza da proteína de origem, que deverá ser de alto valor nutricional, e ao método de hidrólise utilizado (VIEIRA, 2007).

As hidrólises ácida e alcalina são totalmente inespecíficas, podendo destruir aminoácidos como triptofano, lisina, treonina e causar a racemização da maioria dos aminoácidos, comprometendo o valor nutricional da proteína (ADLER-NISSEN, 1981). Com a finalidade de modificar as propriedades funcionais das proteínas tem sido utilizado o processo de hidrólise enzimática, que pode melhorar as propriedades funcionais das proteínas como a solubilidade, o poder emulsificante e a textura (ADACHI et al., 1991).

A hidrólise enzimática é desenvolvida sob condições suaves de pH (entre 6 e 8) e temperatura (entre 40 e 60 °C), evitando os extremos usualmente necessários para os tratamentos físicos e químicos, e minimizando reações paralelas. O uso de enzimas permite um bom controle da hidrólise e, assim, das propriedades dos produtos resultantes. A composição global dos hidrolisados enzimáticos em aminoácidos é semelhante à do material inicial, e, além disso, os hidrolisados proteicos mostram vantagens tecnológicas, como melhor solubilidade, estabilidade térmica e relativamente alta resistência à precipitação por agentes como íons metálicos e pH (CLEMENTE, 2000).

A utilização de proteases específicas apresenta algumas vantagens sobre a hidrólise alcalina ou ácida, como a especificidade, o controle do grau de hidrólise, as condições moderadas de ação, o menor conteúdo de sal no hidrolisado final e, ainda, a formação mínima de subprodutos (MANNHEIM; CHERYAN, 1992; PEARCE, 1995). Além disto, como as enzimas podem ser empregadas, geralmente, em concentrações muito baixas, sua remoção do sistema de reação é frequentemente desnecessária e mais fácil do que para outros catalisadores, os quais devem ser usados em concentrações maiores (REED, 1975).

A enzima Alcalase que é uma enzima comercial largamente empregada na literatura científica. É uma enzima proteolítica isolada de linhagens selecionadas de *Bacillus licheniformis*, sendo seu maior componente enzimático a substilisina Carsberg (STENZEL, 2009). Nos estudos de STENZEL (2007), os resultados dos experimentos indicaram que as condições ótimas para a hidrólise enzimática do farelo de soja desengordurado tostado foram: temperatura de 60 °C, 100 rpm de agitação, concentração de enzima de 1%

(proteína/proteína) e três horas de hidrólise, para a Alcalase e, concentração de enzima de 0,5 % (proteína/proteína) e cinco horas de hidrólise, para a enzima Flavourzyme. Concluiu-se também que não existe necessidade de se corrigir o pH do meio, nem da realização de um processo de moagem mais severa do farelo, uma vez que as alterações nesses parâmetros não levaram à alterações significativas nos resultados de extração da proteína (ABERT; KNEIFEL, 1993; DUARTE et al., 1998; CARREIRA et al., 2002; SILVA et al., 2003 a,b,c).

Além da melhoria das propriedades funcionais e organolépticas, é possível aumentar o aproveitamento nutricional das proteínas pelo tratamento enzimático. O aumento na solubilidade dos hidrolisados é provavelmente causado pelos menores tamanhos moleculares e correspondente aumento no número de grupos ionizáveis (amino e carboxil) expostos (STENZEL, 2007). A solubilidade é uma das propriedades mais importantes das proteínas de soja, sendo necessário conhecer o comportamento desta em diferentes meios para uma aplicação adequada. Conforme Ordonez et al. (2005), a solubilidade da proteína é medida pelo índice de solubilidade de nitrogênio, isto é, a porcentagem de proteína que se mantém em solução ou dispersão coloidal sob condições específicas e que não sedimenta com forças centrífugas moderadas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios foram realizados nos Laboratórios do Grupo de Microbiologia Aplicada e Bioprocessos (GMBio) do Departamento de Biotecnologia (LOT) da Escola de Engenharia de Lorena- EEL-USP.

4.1. Hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho

4.1.1 Obtenção e preparo da matéria-prima (sabugo de milho)

Foi utilizado o sabugo de milho proveniente da RASUL - Indústria e Comércio de Rações Ltda – PR. O sabugo de milho granulado triturado, seco e ensacado (20 kg) foi armazenado a temperatura ambiente até realização das hidrólises.

4.1.2 Hidrólise ácida do sabugo de milho

A hidrólise do sabugo de milho foi realizada na planta piloto de hidrólise do Departamento de Biotecnologia (LOT) da EEL-USP, em reator de aço inox AISI 316 com capacidade volumétrica total de 50 litros, equipado com aquecimento indireto por resistência elétrica. A hidrólise foi realizada conforme metodologia estabelecida por JOSÉ A.H.M (2013). Inicialmente o reator foi abastecido com sabugo de milho (4 kg) e com 50 mg de H_2SO_4 por g de matéria seca, para uma relação sólido - líquido (solução de H_2SO_4) de 1:10. A hidrólise foi à temperatura de 133 °C por 20 minutos. Após este tempo o reator foi desligado e descarregado após 24 h. O hidrolisado obtido foi primeiramente separado da massa residual de sólidos (celulose e lignina) por decantação, e em seguida foi armazenado em câmara fria para posterior caracterização. Esse hidrolisado foi caracterizado, homogeneizado, concentrado (HC) e submetido a tratamento e fermentação.

4.1.3 Concentração a vácuo

A concentração foi realizada em um evaporador (Spencer P-300) com capacidade de 30 L operado de forma descontínua. O hidrolisado original foi evaporado até um fator de concentração correspondente a 2,5, ou seja, 1/2,5 do seu volume inicial. O sistema foi mantido sob vácuo, o qual possibilitou que o líquido evaporasse a aproximadamente 70 °C. Após esta etapa de concentração, foi obtido um hidrolisado concentrado denominado HC.

4.1.4 Tratamento e autoclavagem

O hidrolisado concentrado (HC) foi tratado pelo ajuste do pH e adsorção em carvão vegetal ativado, de acordo com metodologia estabelecida por ALVES et al. (1997). O tratamento correspondeu à adição de CaO comercial para elevação do seu pH inicial, em torno de 1,1, para 7,0, e subsequente abaixamento para 5,5 com H₃PO₄ concentrado. Em seguida utilizou-se 3% de carvão vegetal ativado em pó, da marca Synth. Após adição do carvão vegetal ativado ao hidrolisado, este foi mantido sob agitação mecânica (200 rpm) a 30 °C por 1 h. Nas etapas de alteração de pH, os precipitados formados foram removidos por centrifugação (IEC – CU 500) a 2000 x g por 20 minutos. A remoção do carvão se deu por filtração a vácuo em funil de porcelana do tipo Büchner com papel de filtro qualitativo. O hidrolisado concentrado e tratado, denominado HCT, foi autoclavado a 111 °C por 15 minutos e centrifugado a 2000 x g por 20 minutos, antes de sua utilização como meio de fermentação.

4.2 Hidrólise da proteína de farelo de soja

4.2.1 Obtenção e Preparo da Matéria-Prima

O farelo de soja proveniente da Granja Tec Internacional – Itapira-SP, foi obtido pelo processo de extrusão e prensagem da soja *in natura*. O farelo de soja foi armazenado a 4 °C para posterior utilização na etapa de hidrólise enzimática.

4.2.2 Hidrolise enzimática do farelo de soja

A enzima Alcalase 2,4 L FG (*Novozymes Latin American LTDA*) foi adicionada à suspensão de farelo de soja e água destilada ($10 \text{ g } 100 \text{ mL}^{-1}$) na concentração de 1% (massa de proteína da enzima/massa de proteína do substrato). A reação foi realizada em frascos Erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio a 60°C e 100 rpm. O término da reação foi após 3 h pela imersão da suspensão em banho de gelo por 10 min (STENZEL, 2009). O hidrolisado foi centrifugado e filtrado com papel de filtro quantitativo. O sobrenadante foi autoclavado a 111°C por 15 minutos e centrifugado assepticamente. A análise da concentração da proteína solubilizada (extraída do farelo) foi determinada pelo método de Lowry.

4.3 Avaliação da solubilidade da proteína extraída do farelo de soja em hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho

Os ensaios foram realizados de acordo com planejamento experimental completo 2^2 com face centrada e com 3 repetições no ponto central. A Tabela 4.1 mostra os fatores e níveis avaliados no planejamento experimental. Todos os ensaios foram realizados a 30°C . O hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho teve seu pH acertado de acordo com o planejamento (Tabela 4.1) após seu tratamento (mencionado no item 4.1.4). A variável resposta destes ensaios foi a concentração de proteína obtida em cada condição experimental. De acordo com os resultados obtidos nestes ensaios decidiu-se qual proporção, em massa de proteína/volume de meio, seria utilizada na avaliação deste nutriente na produção de etanol por *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054.

Tabela 4.1: Fatores e níveis avaliados no planejamento fatorial 2^2 completo.

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
Hidrolisado de farelo de soja (g/L)	0,0	2,5	5,0
pH inicial do hidrolisado	4,0	5,5	7,0

Os níveis dos fatores foram codificados de acordo com a equação 4.1 (BARROS-NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1995):

$$X = \frac{V_R - \sum V_R / 2}{(V_{R_2} - V_{R_1}) / 2} \quad (4.1)$$

Em que: X é o valor codificado da variável;

V_R é o valor real da variável;

$\sum V_R / 2$ é a média dos valores reais da variável;

V_{R1} é o valor real mínimo da variável;

V_{R2} é o valor real máximo da variável.

4.4 Avaliação da suplementação nutricional do hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho com proteína de farelo de soja solubilizada

4.4.1 Microrganismo

Foi utilizada a levedura *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054 proveniente da coleção de cultura do *USDA Forest Service, Forest Products Laboratory* Wisconsin-WI (USA), mantidas em tubos de Agar malte inclinados e conservados a 4 °C.

4.4.2 Preparo do inóculo

O inóculo foi obtido a partir de uma alçada da cultura estoque, recém-repicada (24 h) e transferida para frasco Erlenmeyer de 1000 mL contendo 400 mL de meio hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho sem concentrar e tratado suplementado com (g/L): $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$, 6; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,2. O cultivo foi realizado em incubadora de movimento rotatório (*New Brunswick, Scientific Co.*), com agitação de 200 rpm, à 30 °C, por 24 h. Em seguida as células foram recuperadas por centrifugação (2000 x g por 20 min) e lavadas com água destilada esterilizada, centrifugadas novamente e após o descarte do sobrenadante foi utilizado para preparar uma suspensão de células, a qual foi empregada como inóculo.

4.4.3 Meio de fermentação, condições de fermentação e metodologia estatística

O meio de fermentação foi preparado com o hidrolisado de sabugo de milho concentrado e tratado (HCT) de acordo com o item 4.1 e sua suplementação foi realizada de acordo com planejamento experimental 2^3 , com face centrada, e 3 repetições no ponto

central. A Tabela 4.2 mostra os fatores e os níveis dos nutrientes avaliados no planejamento experimental. Os ensaios foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL do meio de fermentação (pH = 5,5), inoculados com *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054 (1,5 g/L) cultivadas nas condições descritas no preparo do inóculo (item 4.4.2) e incubadas a 30 °C, em incubadora de movimento rotatório (New Brunswick, Scientific Co.) a 150 rpm. Amostras foram retiradas em períodos adequados (0h, 12h, 24h, 48h, 72h, 96h, 120h e 144h) para acompanhamento das concentrações dos açúcares (glicose, xilose e arabinose), acetato, etanol, glicerol, variação de pH quantificação de proteína e crescimento celular durante as fermentações.

Tabela 4.2: Fatores e níveis avaliados no planejamento fatorial 2^3 completo.

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
Uréia (g/L)	0	3,0	6,0
Sulfato de Amônio (g/L)	0	3,0	6,0
Hidrolisado de Farelo de Soja (g/L)	0	2,5	5,0

Os níveis dos fatores foram codificados de acordo com a equação geral (4.1) apresentada no item 4.3 (BARROS-NETO; SCARMINIO; BRUNS, 1995). O *software Design-Expert version 6.06* foi utilizado para análise dos resultados obtidos pelo planejamento fatorial.

4.5. Métodos analíticos

4.5.1. Determinação do teor de umidade das matérias-primas: sabugo de milho e farelo de soja

O teor de umidade das matérias primas (sabugo de milho e farelo de soja) foi determinado em balança semi-analítica MARTE ID50 equipada com secador de infravermelho a 105 °C. Para esta determinação foi utilizado aproximadamente 1,0 g de sabugo úmido e ou farelo de soja. O teor de umidade do sabugo foi utilizado nos cálculos para quantificação do volume de ácido necessário no processo de hidrólise ácida e na análise composicional do sabugo de milho.

4.5.2. Análise composicional do sabugo de milho *in natura* e após hidrólise ácida

O procedimento para realização da análise composicional do sabugo de milho foi baseado na metodologia estabelecida pelo Laboratório Norte-Americano NREL (2009), (*National Renewable Energy Laboratory*), (*Standard Procedures for Biomass Compositional Analysis*). O objetivo foi quantificar os seguintes componentes da biomassa: celulose, hemicelulose e lignina (lignina insolúvel e lignina solúvel). A metodologia descrita a seguir é adequada para amostras que não contenham extrativos.

Preparo das amostras

As amostras foram preparadas de acordo com o procedimento Padrão do NREL, envolvendo etapas de secagem, moagem e peneiramento (20 *mesh*). Desta forma obteve-se um material uniforme e adequado para análise composicional de uma maneira reprodutível. Estas etapas estão envolvidas na determinação de sólidos totais e umidade do sabugo de milho. Para adequação desta metodologia para a análise composicional foi importante também à remoção de extrativos das amostras.

4.5.2.1. Determinação do teor de cinzas

Esta análise visa à determinação da quantidade de material inorgânico na biomassa, seja estrutural ou extraída, como parte da composição total. As amostras foram preparadas de acordo com o procedimento Padrão do NREL e pesadas na sequência para a realização desta análise. Os cadinhos para incineração foram rotulados apropriadamente e colocados na mufla a 575°C por um período de 4 horas. Os cadinhos foram retirados da mufla e acondicionados em dessecador por 1 hora e pesados. O procedimento de aquecimento em mufla e resfriamento em dessecador foram repetidos de hora em hora até se obter massas constantes dos cadinhos. Pesar-se aproximadamente 1 g da amostra no cadinho tarado e anotar o peso. Colocou-se o cadinho e amostra na mufla e manteve-se estes a 575 °C por 24 h. Desligou-se a mufla e deixou resfriar e retirou cuidadosamente os cadinhos da mufla diretamente para o dessecador e deixou resfriar até temperatura ambiente. Pesar os cadinhos e cinzas e anotar o peso.

O teor de cinzas totais presentes nas amostras foi calculado empregando-se a Equação 4.2

$$\%Cinzas = \left(\frac{massa_{cadinho+cinzas} - massa_{cadinho}}{Massa_{amostra}} \right) * 100 \quad (4.2)$$

4.5.2.2. Determinação de carboidratos estruturais e lignina no sabugo de milho

Esta etapa visou quantificar os seguintes componentes do sabugo de milho: celobiose, glicose, xilose, galactose, manose, lignina (lignina insolúvel e lignina solúvel). Este procedimento foi adequado para amostras preparadas após a determinação de sólidos totais e umidade do sabugo de milho que estão descritas no procedimento Padrão do NREL (2009).

As amostras a serem analisadas devem conter entre 5 e 10% de umidade. A massa utilizada de cada amostra deve ser corrigida em função de sua umidade e sólidos totais. A preparação destas amostras para a determinação de carboidratos estruturais e lignina (solúvel e insolúvel) envolvem as etapas de hidrólise ácida. Para isso, Pesou-se aproximadamente 0,3 g da amostra e colocou-se em tubo de ensaio e anotou-se o peso. Adicionou-se 3,00 mL de ácido sulfúrico a 72% em cada tubo de ensaio. Colocou-se o tubo em um banho térmico regulado a 30 °C e incubou-se a amostra por 60 minutos sob agitação vigorosa com bastão de vidro a cada 5 a 10 minutos sem remover a amostra do banho. Após a realização da hidrólise ácida concentrada, removeu-se os tubos do banho térmico e diluiu-se o ácido a uma concentração de 4% pela adição de 84,00 mL de água destilada e transferiu-se o conteúdo para um frasco Erlenmeyer de 125 mL. Selaram-se os frascos Erlenmeyer com folhas de alumínio. Em seguida estes frascos foram autoclavados a 121 °C por 1h, para completa hidrólise dos oligômeros restantes.

Na sequência esperou-se os frascos esfriarem lentamente para retirada da folha alumínio. A mistura reacional de cada frasco Erlenmeyer de 125mL que contem o resíduo sólido (lignina insolúvel e cinzas) foi filtrada em filtro de vidro (GF-3) previamente seco em estufa a 105 °C e tarado juntamente com o pesa filtro. Todo o sólido do Erlenmeyer de 125 mL foi coletado pela lavagem com 113 mL de água destilada. Desta forma, o filtrado (200 mL) foi coletado em frasco Erlenmeyer de 250 mL. Os sólidos coletados foram direcionados para a determinação de lignina insolúvel e o filtrado (hidrolisado) foi utilizado para a determinação de lignina solúvel e carboidratos. Uma solução, sem conter o hidrolisado, porém nas mesmas condições, foi preparada e chamada de ‘branco’, para ser utilizado na análise de lignina solúvel.

Determinação de lignina solúvel

Esta análise foi realizada no prazo de 6 horas após a preparação da amostra em espectrofotômetro de UV-Visível utilizando como branco a solução preparada previamente. A absorbância da amostra foi medida no comprimento de onda de 205 nm, num espectrofotômetro de UV-Visível utilizando cubeta de quartzo. A amostra foi diluída para uma absorbância na faixa de 0,2 a 1,0. Para isso, foram transferidos 4 mL do filtrado (hidrolisado) obtido no item 4.5.2.2. para um balão volumétrico de 100 mL aferido com água destilada (diluição da amostra foi de 1:25). Deste filtrado (hidrolisado diluído) foram separados 40 mL para a determinação de carboidratos por HPLC (item 4.5.7). Para a determinação da porcentagem da lignina solúvel, calcula-se conforme Equação 4.3, mostrada a seguir:

$$\%LigninaSolúvel = \frac{A}{a \times b} \times FD \times \frac{V}{M_{amostra}} \times 29 \times 100 \quad (4.3)$$

Onde:

A = absorbância a 205 nm.

a = absortividade, 110 L/g.cm.

b = caminho ótico (1cm).

FD = Fator de diluição.

V = volume da solução inicial de H₂SO₄ a 72% (m/m) (L)

M_{amostra} = massa seco da amostra inicial.

Determinação de lignina insolúvel

Os filtros de vidro contendo os resíduos sólidos e ácido obtidos no item 4.5.2.2. foram colocados em pesa-filtros previamente tarados e secos em estufa a 105 °C até atingir massa constata. As amostras foram retiradas da estufa e transferidas para dessecador para serem pesadas. As amostras foram colocadas na estufa e dessecador até massa constante. A seguir, estes filtros de vidro secos, foram transferidos a cadinhos de incineração preparados de acordo com o procedimento Padrão do NREL (2009). A seguir (cadinho e filtro de vidro seco) foram levados à mufla a 575 °C por 24. A seguir, os cadinhos foram retirados

cuidadosamente da mufla e levados diretamente para um dessecador por 1 h. Após, pesou-se os cadinhos e cinzas.

A lignina insolúvel por sua vez foi determinada através da Equação 4.4:

$$\%Lignina\ Insolúvel = \left(\frac{(massa_{C2} - massa_{C1}) - (massa_{R2} - massa_{R1})}{Massa_{amostra}} \right) * 100$$

(4.4)

Onde:

Massa_{R2} = Massa do pesa filtro contendo o micro-filtro com resíduo insolúvel;

Massa_{R1} = Massa do pesa filtro contendo micro-filtro

Massa_{C2} = Massa do cadinho com cinzas

Massa_{C1} = Massa do cadinho

Como a lignina apresentada é livre de extrativos, devemos fazer uma correção para que os extrativos sejam considerados, assim, essa correção foi feita segundo a Equação 4.5:

$$\%Lignina\ insolúvel_{corrigida} = \%Lignina\ insolúvel * \left(\frac{100 - \%Extrativos}{100} \right)$$

(4.5)

Determinação de carboidratos e determinação dos teores de hemicelulose e celulose no sabugo de milho

O filtrado da hidrólise (antes da lavagem do resíduo) mencionada no item 4.5.2.2 foi analisado da seguinte maneira: As concentrações dos açúcares glicose, xilose, arabinose, bem como de ácido acético, foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) (item 4.5.7). As amostras, após devidamente foram filtradas em filtro Sep Pak C18 (Millipore) e o eluente, antes do uso, foi filtrado a vácuo em membrana de éster de celulose, 0,45 µm de poro, 47 mm de diâmetro (Millipore) e simultaneamente foi degaseificado em banho de ultra-som (Thornton) por 25 minutos (RODRIGUES 2005).

Para a determinação da quantidade (%) de hemicelulose e celulose no sabugo de milho foram utilizadas as equações (4.6 e 4.7) para os respectivos cálculos:

$$\% \text{ hemicelulose} = \left(\frac{C_{\text{xilose}} \times 50 + C_{\text{arabinose}} \times 50}{\text{massa da amostra (g)} \times \text{massa seca da amostra em \%}} \right) \times FC_h \times FPH_h \times 100$$

(4.6)

Onde:

C_{xilose} = Concentração de D-xilose, em g/L

$C_{\text{arabinose}}$ = Concentração de D-arabinose, em g/L

FC_h = Fator de conversão para hemicelulose = 0,88

FPH_h = Fator de perda de hidrolisado para hemicelulose = 1,155

$$\% \text{ Celulose} = \left(\frac{C_{\text{glicose}} \times 50}{\text{massa da amostra (g)} \times \text{massa seca da amostra em \%}} \right) \times FC_c \times FPH_c \times 100$$

(4.7)

Em que:

C_{glicose} = Concentração de D-glicose, em g/L

FC_c = Fator de conversão para celulose = 0,99

FPH_c = Fator de perda de hidrolisado para celulose = 1,055

4.5.3. Caracterização do Farelo de Soja

A caracterização do farelo de soja foi realizada pela empresa Labtron – Tecnologia de análises situada na cidade de Itapira-SP. A metodologia empregada esta descrita a seguir.

4.5.3.1 Determinação de proteína bruta

O teor de nitrogênio e proteína foi determinado, de acordo com o método de Kjeldahl, descrito pela AOAC (1984) e Chang (1998). Utilizando-se por tratamento, amostra de 100 mg de farelo de soja, adicionando-se 10 mL da mistura digestora (5,0 g de sulfato de cobre II penta-hidratado e 5,0 g de óxido e selênio II, dissolvidos em 500 mL de ácido sulfúrico concentrado). Esta solução foi aquecida até a mesma tornar-se translúcida. Após resfriamento, adicionou-se 1,0 mL de peróxido de hidrogênio a 30%, aquecendo-se, a seguir, por mais 30 minutos. Em seguida, foram lavadas as paredes dos tubos resfriados com água destilada e foi efetuada a transferência do material para o aparelho de destilação. No aparelho fez-se reagir o material com 35% de hidróxido de sódio a 40%, recolhendo-se o gás amônia em 25 mL de ácido bórico a 4%. A seguir, foi titulada a solução com ácido clorídrico 0,005 mol/L. O teor de nitrogênio foi determinado de acordo com a Equação 4.8:

$$\%N = \frac{V \times M \times f \times 14}{m} \times 100 \quad (4.8)$$

Em que:

V = Volume de ácido clorídrico gasto na titulação;

M = Molaridade do ácido clorídrico;

f = Fator de padronização do ácido, e

m = Massa da amostra.

Após obtenção do percentual de nitrogênio, foi utilizado o fator 6,25 no cálculo de proteína bruta.

4.5.3.2 Determinação de lipídeos

Esta determinação baseiou-se na extração da fração gordurosa e demais substâncias solúveis através de arraste por solvente. Uma amostra de aproximadamente 3 g de farelo de soja foi transferida para cartucho extrator. Estes cartuchos foram secos a 105 °C por 2 horas. Da mesma forma, o balão ou copo foi seco em estufa a 105 °C por uma hora, esfriado em dessecador até a temperatura ambiente e pesado. O cartucho foi colocado no extrator. A seguir foi adicionada uma quantidade suficiente de solvente ao balão ou copo, conectando-o ao extrator, ajustou-se o conjunto ao condensador. A extração ocorreu por

um período de, no mínimo, 6 horas a velocidade de condensação de 2 a 4 gotas por segundo. Recuperou-se o solvente e completou-se a secagem do balão ou copo em estufa a 105 °C por 30 minutos. Este material foi esfriado em dessecador até temperatura ambiente e pesado. Esta operação de secagem foi repetida até que a diferença entre duas pesagens sucessivas não fosse superior a 0,1% do peso da amostra (AOAC, 1975). Sempre foi conduzida uma prova em branco para testar a qualidade do solvente utilizado. O cálculo da % de lipídeos foi de acordo com a Equação (4.9):

$$\% \text{ lipídeos} = \frac{(\text{Massa do balão com óleo} - \text{Massa do balão}) \times 100}{\text{Massa da amostra}} \quad (4.9)$$

4.5.3.3 Solubilidade proteica em hidróxido de potássio do farelo de soja

Para determinar o efeito do processamento térmico da soja sobre a qualidade da proteína no farelo foi utilizada solubilidade da proteína em hidróxido de potássio (KOH) a 0,2% estimada conforme metodologia proposta por ARABA; DALE (1990). Para esta análise foi empregado 1,5 g de uma amostra de farelo de soja devidamente moída (60 *mesh*) adicionada de 75 mL de uma solução de KOH (0,2%). Esta mistura foi homogeneizada por 20 minutos a 22 °C sob agitação magnética. Após contagem do tempo, uma alíquota de 50 mL foi centrifugada a 1250 x g por 10 minutos. Do sobrenadante foram coletados 15 mL para quantificação da proteína solubilizada pelo método macro de Kjeldahl (mg N/mL). A solubilidade da proteína foi calculada com relação ao total na amostra original.

4.5.4. Determinação do teor de proteína no hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho na presença ou ausência de farelo de soja

A quantidade de proteína de farelo de soja solubilizada no hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho foi determinada a partir da concentração de proteína em solução, obtida pelo Método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951). Para verificação de interferentes durante a determinação de proteínas pelo método de Lowry, realizou-se um teste seguindo protocolo do laboratório de Scott Hsieh (UCLA, 2007).

4.5.5. Determinação da atividade específica da enzima alcalase

A atividade específica da enzima Alcalase 2,4 L FG (Novozymes Latin American LTDA) foi determinada pelo método proposto por Toro e García-Carreno (2002). Foram adicionados 10 µL de solução 1% (m/v) do preparado enzimático em 0,5 mL de tampão Tris HCL 50 mM pH 8,0, mantido em banho seco a 25 °C. Aos tubos relativos ao branco da reação foram adicionados de 0,5 mL de TCA 20% (m/v). A reação foi iniciada adicionando-se 0,5 mL de solução de azocaseína 1% (m/v) em todos os tubos que, em seguida foram incubados por 10 minutos. A reação foi interrompida adicionando-se 0,5 mL de TCA 20%. Os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 20 minutos em centrífuga de microtubos. O sobrenadante foi separado e a absorbância lida em 366 nm.

A reação para o branco e para a enzima foi feita em triplicata e a média das leituras do branco (A_{366} Branco) foi subtraída da média das leituras da enzima (A_{366} amostra). O cálculo para a atividade específica foi realizada conforme equação (4.10).

$$\text{Atividade (U / mg)} = \frac{(A_{366}\text{ amostra} - A_{366}\text{ Branco})}{[\text{tempo(min)}] \times [\text{massa enzima(mg)}]} \quad (4.10)$$

O tempo foi de 10 minutos (conforme o protocolo supracitado) e a massa de enzima (presente em 10 µL de solução) foi de 0,1 mg de preparado enzimático comercial.

4.5.6. Pureza da cultura, viabilidade e morfologia celular

A viabilidade da cultura foi verificada a partir de visualizações microscópicas (Nikon, modelo SC) de lâminas preparadas a fresco, onde as células foram coradas pela adição de igual volume de uma solução 0,01% (m/v) de azul de metileno dissolvido em citrato de sódio 2 % (m/v). A pureza e a morfologia celular foram verificadas a partir de visualizações microscópicas de lâminas fixadas e coradas com fucsina.

4.5.7. Determinação da concentração celular

A concentração celular foi determinada por densidade ótica a 600 nm, a partir de uma curva padrão obtida pela correlação entre a absorbância a 600 nm e a concentração de células determinada pela técnica de massa seca de células cultivadas em meio semi-definido. Uma amostra de meio de fermentação sem células foi utilizada como branco.

4.5.8. Determinação da concentração de açúcares, ácido acético, glicerol e etanol

As concentrações dos açúcares glicose, xilose, arabinose, bem como de ácido acético, etanol e glicerol foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), empregando-se as seguintes condições: coluna Bio Rad Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm); temperatura da coluna, 45 °C; temperatura do detector, 35 °C; detector de índice de refração Waters 410; eluente, solução de H₂SO₄ 0,005M, fluxo de 0,6 mL/min.; volume da amostra injetada, 20 µL. As amostras, após devidamente diluídas, foram filtradas em filtro Sep Pak C18 (Millipore) e o eluente, antes do uso, foi filtrado a vácuo em membrana de éster de celulose, 0,45 µm de poro e simultaneamente foi degaseificado em banho de ultra-som (Thornton) por 25 minutos (RODRIGUES, 2005).

4.5.9. Determinação da concentração de furfural, hidroximetilfurfural, ácido p-hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido siringico, vanilina, ácido p-cumárico e ácido ferúlico

As concentrações de furfural e hidroximetilfurfural no hidrolisado foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) de acordo com Rodrigues (2005), empregando-se as seguintes condições: coluna Waters Resolvetm 5 µ Spherical C18 (3,9 x 300 mm); temperatura da coluna, 25 °C; detector de ultravioleta Waters 2487 no comprimento de onda de 276 nm; eluente, solução de acetonitrila/água (1:8) com 1% de ácido acético; volume da amostra injetada, 20 µL. As amostras foram devidamente diluídas e filtradas em filtros Swennex com membrana HA de éster de celulose, 0,45 µm de poro e 13 mm de diâmetro (Millipore). Na composição do eluente, a água deionizada foi filtrada a vácuo empregando-se membrana HA em éster de celulose, 0,45 µm de poro e os outros componentes como ácido acético e acetonitrila foram, nas proporções adequadas, adicionados à água devidamente filtrada. Em seguida o eluente foi

degaseificado em banho de ultra-som (Thornton) por 15 minutos e deixado, antes de ser utilizado, em repouso por 10 minutos.

4.5.10. Determinação da concentração de fenóis totais

A análise de fenóis totais presentes nas amostras de hidrolisado foi realizada pela utilização do reagente de Folin-Ciocalteu. Cada amostra (0,1 mL em uma diluição apropriada) foi adicionada de 4,2 mL de água deionizada e 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu (Sigma) e homogeneizada por 1min. Após este procedimento 80% de uma solução de carbonato de sódio e 4,2 mL de água deionizada foi adicionada ao meio reacional. Esta mistura foi deixada em repouso por 2 horas em ambiente escuro. Após este tempo foram realizadas leituras de absorbância a 760 nm em uma cubeta de 1 cm, contra um branco obtido pelo mesmo procedimento, contendo água ao invés de vanilina. A concentração de fenóis foi expressa como equivalentes de vanilina, em g/L.

4.5.11. Determinação de metais

Os metais (Cálcio, Cobre, Cromo, Enxofre, Ferro, Manganês, Magnésio, Níquel, Potássio, Sódio e Zinco) foram determinados por espectrometria de absorção atômica por chama, num equipamento PerkinElmer modelo Analyst 800. Empregou-se 1 ou 2 mL da amostra, medida quantitativamente, a qual foi transferida para um Becker de vidro adicionando-se aproximadamente 5 mL de água Millipore (18,2 mΩ.cm) seguida do aquecimento em chapa. Durante esta etapa adicionou-se um volume correspondente a 2 a 3 mL de uma mistura ácida de HNO₃: HCl para digerir o açúcar transformando-o em CO₂. O tempo de digestão foi de 3 a 4 horas ou até se notar visualmente a mudança da cor inicial. Após a digestão, a amostra foi resfriada e transferida quantitativamente para um balão volumétrico e diluída com água Millipore em função de sua concentração e da sensibilidade do equipamento.

4.5.12. Determinação do pH e condutividade elétrica do hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho

O pH e a condutividade das amostras de hidrolisados hemicelulósicos de sabugo de milho obtidas sob diferentes condições experimentais foi determinado em pH/conduvímeter marca Mettler Toledo modelo SevenGO Duo-SG23.

4.6. Determinação dos parâmetros fermentativos

4.6.1. Fator de conversão de açúcares em etanol e de açúcares em célula

O fator de conversão expressa: massa de etanol produzido por massa de xilose consumida ($Y_{p/s}$) e massa de célula produzida por massa de açúcares (glicose e xilose) consumidos ($Y_{x/s}$), em gramas, e foram calculados pelas seguintes equações (STAMBURY *et al.*, 1995):

$$Y_{x/s} = \frac{-\Delta x}{\Delta s} = \frac{X_f - X_i}{S_f - S_i} \quad (4.11)$$

$$Y_{p/s} = \frac{-\Delta p}{\Delta s} = \frac{P_f - P_i}{S_f - S_i} \quad (4.12)$$

Em que: S_i e S_f correspondem às concentrações inicial e final de açúcares;

P_i e P_f correspondem às concentrações inicial e final de etanol.

X_i e X_f correspondem às concentrações inicial e final de células

4.6.2. Produtividade volumétrica de etanol (Q_p)

A produtividade volumétrica de etanol expressa a concentração de etanol produzida (g/L) por tempo (h). Foi calculada de acordo com a seguinte equação (STAMBURY *et al.*, 1995):

$$Q_p = \frac{\Delta p}{\Delta t} = \frac{P_f - P_i}{t_f - t_i} \quad (4.13)$$

Em que P_i e P_f correspondem às concentrações inicial e final de etanol.

t_i e t_f correspondem aos tempos inicial e final de fermentação.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização química do sabugo de milho

A caracterização química do sabugo de milho *in natura* e do sabugo após ser submetido à hidrólise ácida se encontram na Tabela 5.1.

Tabela 5.1: Componentes estruturais e não estruturais do sabugo de milho.

Componentes (%)	SM – A	SM - B	SM - C
Celulose	35,96 ± 3,02	68,72 ± 1,79	32,34 ± 1,03
Hemicelulose	36,32 ± 3,76	8,80 ± 0,95	4,34 ± 0,40
Lignina Insolúvel (Klason)	16,88 ± 1,03	12,31 ± 1,14	5,79 ± 1,10
Cinzas	1,75 ± 0,02	0,52 ± 0,02	0,25 ± 0,02
Sólidos hidrolisados a partir do sabugo <i>in natura</i>	nd	nd	52,94 ± 0,01
Total	92,8852 ± 5,7698	91,9698 ± 0,5262	95,6600 ± 0,6062

SM = sabugo de milho; SM – A = sabugo de milho *in natura*; SM – B = sabugo de milho após hidrólise ácida; SM – C = sabugo de milho após hidrólise ácida e com correção da recuperação mássica (47,06 %); nd = não determinado.

Os valores da tabela encontram-se muito próximos dos relatados na literatura como mostra Raj et al. (2015). De acordo com esses autores o teor de celulose foi de 32,2%, da hemicelulose foi de 29,0% e de lignina foi de 18,4%.

O sabugo de milho *in natura* apresentou um baixo teor de cinzas (em torno de 1,75%) (Tabela 5.1), o que, de acordo com Pandey et al. (2000), representa vantagem para uso em processos de bioconversão em comparação a outros resíduos agrícolas, como palha de arroz e palha de trigo, os quais apresentam teor de cinzas de 17,5 e 11,0%, respectivamente.

Do total de sabugo de milho *in natura* obteve-se um rendimento residual de sabugo após hidrólise (SM - C) de 47,06%, constituído principalmente das frações celulósica, hemicelulósica (polioses) e lignina, nas proporções aproximadas de 32,34; 4,34 e 5,79%, respectivamente (Tabela 5.1).

De acordo com Herrera et al. (2003), ácidos diluídos conduzem a uma condição limitada de hidrólise conhecida como pré-hidrólise, consistindo na hidrólise da fração hemicelulósica, permanecendo as frações celulósicas e de lignina quase inalteradas. Este fato pode ser constatado pela caracterização do sabugo após hidrólise ácida nas condições

empregadas neste trabalho, o qual favoreceu a remoção da fração hemicelulósica em 88,05% com pouca alteração na celulose (10,06%) e lignina (65,70%) com relação ao material *in natura* (Tabela 5.1).

Na caracterização do sabugo de milho *in natura*, obteve-se $33,32 \pm 3,01\%$ de D-xilose na fração hemicelulósica, correspondendo a aproximadamente 91,74% desta fração. De acordo com Pandey et al. (2000) a fração hemicelulósica de resíduos não apresenta utilidade na geração de vapor e energia. Desta maneira, se esta fração for hidrolisada (parcialmente ou completamente), pode gerar um bom substrato para o cultivo de microrganismos que utilizam a xilose como fonte de carbono.

5.1.1. Hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho

Os hidrolisados hemicelulósicos original (HO), concentrado (HC) e concentrado tratado (HCT) foram caracterizados com relação às suas propriedades físicas (pH e condutividade elétrica), bem como seus teores de açúcares e de compostos considerados inibitórios da atividade fermentativa, como ácido acético, produtos da degradação da lignina (compostos fenólicos) e da degradação de açúcares (compostos furanos). Também foi analisado o teor de proteína destes hidrolisados (Tabela 5.2).

De acordo com Rodriguez-Chong et al. (2004), são considerados de interesse industrial somente processos de hidrólise que apresentem rendimentos iguais ou maiores a 20 g/L de açúcares, ou seja, somente o rendimento de xilose obtido de 28,30 g/L (Tabela 5.2) já viabilizaria industrialmente o processo de hidrólise ácida empregado neste trabalho. Durante a hidrólise ácida do sabugo de milho, outros açúcares foram liberados no meio, como D-glicose (1,65 g/L) e arabinose (1,84 g/L), porém em concentrações mais baixas que a D-xilose (28,30 g/L). A D-glicose é um dos produtos da hidrólise ácida do sabugo de milho podendo ser liberada tanto da fração celulósica quanto da hemicelulósica (AGUILAR et al. 2002), porém glicose a partir de celulose não é facilmente hidrolisada nas condições de hidrólise empregada neste trabalho. No caso da arabinose, que é formada a partir de arabinoxilanas, heteropolímero hemicelulósico, a concentração de xilose é maior que a da arabinose (AGUILAR et al., 2002).

Tabela 5.2: Caracterização dos Hidrolisados: original (HO), concentrado (HC), concentrado e tratado (HCT).

		HO	HC	HCT
Propriedades Físicas	pH	1,22	1,01	5,51
	Condutividade	19,66	26,0	12,95
Açúcares (g/L)	Xilose	28,30	70,65	73,34
	Glicose	1,65	4,308	3,38
	Arabinose	1,84	4,650	5,63
	Acido Acético	1,44	2,67	3,12
Produtos da degradação de açúcares (mg/L)				
(compostos furanos)	Furfural	282,0	62,0	2,0
	Hidroximetilfurfural	295,0	472,0	13,0
Produtos da degradação de lignina (mg/L)				
(Compostos fenólicos)	Fenóis totais	398,00	876,00	85,60
	Ac. p-hidroxibenzoico	5,00	17,00	1,00
	Acido Vanílico	3,00	14,00	2,00
	Acido Siringico	20,00	58,00	2,00
	Vanilina	41,00	19,00	0,00
	Ac. p-cumarico	85,00	154,00	2,00
	Acido Ferulico	394,00	508,00	7,00
Inorgânicos (mg/kg)	Cálcio	23,83	77,89	3072,64
	Cromo	15,53	69,99	27,26
	Cobre	0,00	0,00	0,00
	Ferro	102,74	379,14	8,96
	Potássio	685,61	1949,01	1863,01
	Magnésio	30,77	84,14	173,41
	Manganês	2,99	10,20	12,62
	Sódio	32,51	72,16	74,95
	Níquel	11,29	48,45	33,91
	Enxofre	1535,79	4208,31	407,83
	Zinco	1,64	6,50	0,482

A quantidade de D-xilose ainda é considerada baixa para uma boa bioconversão de D-xilose em etanol. Assim, para aumentar o teor de D-xilose, se fez necessário submeter o hidrolisado ao processo de concentração a vácuo. Observa-se na Tabela 5.2 que a concentração em 2,5 vezes o volume inicial do hidrolisado original resultou aumento aproximadamente proporcional de D-xilose, D-glicose e L-arabinose no hidrolisado concentrado (HC). Pode-se observar que a concentração de D-xilose no hidrolisado concentrado e tratado, bem como dos açúcares D-glicose e L-arabinose permaneceram praticamente inalteradas, indicando que não ocorreu remoção significativa destes açúcares durante o seu tratamento (Tabela 5.2).

Hidrólise ácida de materiais lignocelulósicos é um método bem conhecido para obtenção de hidrolisados fermentecíveis. A Tabela 5.2, mostra que, além dos açúcares, estão também presentes nos hidrolisados compostos que inibem a fermentação dos açúcares pelos microrganismos (MIYAFUJI et al., 2003; CARVALHEIRO et al., 2005). Dentre estes compostos encontram-se o ácido acético, proveniente da quebra dos grupos acetil presentes na hemicelulose; furfural e 5-hidrometilfurfural (5-HMF), formados a partir da desidratação de pentoses e hexoses, respectivamente (FENGEL; WEGENER, 1989) e compostos fenólicos, ácido p-hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido siríngico, vanilina, ácido ferúlico e ácido p-cumárico que são produtos de degradação da lignina (PALMQVIST; HAHN-HÄGERDAL, 2000). Todos estes compostos apresentaram elevação em seus teores após a concentração a vácuo do hidrolisado (Tabela 5.2).

Com relação aos fenóis totais observou-se uma redução de 90,3% em sua concentração no hidrolisado tratado (HCT), em relação ao hidrolisado concentrado (HC), que deve ser atribuída em grande parte à adsorção do hidrolisado com carvão. De acordo com Rodrigues et al. (2001) o tratamento do hidrolisado concentrado com somente de 3% de carvão vegetal ativado removeu 92,92% de compostos fenólicos totais. Este fato também pode explicar a diminuição nos teores de hidroximetilfurfural, ácido p-cumárico e ácido ferúlico em 97,25%, 98,70% e 98,62%, respectivamente, após tratamento do hidrolisado concentrado (Tabela 5.2).

Dentre os compostos voláteis analisados como furfural, vanilina e ácido acético, foi observado que durante o processo de concentração a vácuo ocorreu renovação parcial de 78,01, 53,66 e 25,83%, respectivamente ao se empregar o fator de concentração do hidrolisado de 2,5 do seu valor inicial. No entanto, após tratamento, tanto o furfural quanto a vanilina foram removidos em 96,77 e 100%, respectivamente, em comparação ao hidrolisado concentrado. No hidrolisado concentrado e tratado (HCT), o ácido acético não apresentou remoção significativa em relação ao hidrolisado concentrado (HC) e ainda pode-se observar que o ácido acético é o composto inibitório presente em maior concentração (3,12 g/L).

Rodrigues et al. (2001) observaram através do estudo do processo de concentração a vácuo do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana, redução de 90% e de 63,9% nos teores de furfural e ácido acético, respectivamente. De acordo com Palmqvist et al. (2000), o processo de concentração a vácuo do hidrolisado hemicelulósico pode ser considerado como um método físico de destoxificação do hidrolisado, uma vez que proporciona a

remoção de compostos voláteis como ácido acético (54%), furfural (100%) e vanilina (29%).

Dentre os compostos inibidores do metabolismo microbiano presentes em hidrolisados hemicelulósicos, os produtos derivados da lignina são considerados os mais tóxicos ao microrganismo e apresentam uma alta potencialidade inibitória a baixas concentrações, superando o furfural e o hidroximetilfurfural (PARAJÓ et al., 1998).

Na Tabela 5.2, observa-se que houve uma redução no valor de pH após a etapa de concentração, diminuindo de 1,22 para 1,01. Esta redução se deve principalmente ao aumento da concentração de íons H^+ proveniente do H_2SO_4 utilizado na hidrólise do sabugo, além do aumento da concentração de outros ácidos presentes no meio. Este mesmo comportamento foi observado por Rodrigues et al. (2001). É importante também observar que no hidrolisado concentrado a condutividade elétrica aumentou seu valor aproximadamente 1,4 vezes em relação ao hidrolisado original, provavelmente devido ao acréscimo na concentração de alguns íons presentes no hidrolisado (Tabela 5.2).

Após tratamento do hidrolisado concentrado (HCT) observou-se que a condutividade elétrica foi reduzida em 50,19% em relação ao concentrado (HC), indicando que o tratamento removeu grande parte dos íons presentes. Foram identificados no hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho alguns minerais (Tabela 5.2), entre eles o magnésio, o cálcio, o zinco e o manganês. O alto valor de enxofre (1535,79 mg/kg) no hidrolisado original se deve a hidrólise com ácido sulfúrico diluído. E o alto valor de cálcio (3072,64 mg/kg) no hidrolisado concentrado e tratado se deve ao tipo de tratamento do hidrolisado utilizado neste trabalho, que correspondeu à adição de CaO comercial para elevação do seu pH inicial, em torno de 1,1 para 7,0 e subsequente abaixamento para 5,5 com H_3PO_4 concentrado. De acordo com Ranatunga et al. (2000), tratamento pela elevação do pH (“overliming”) é um procedimento para reduzir a toxicidade de hidrolisados. Teoricamente, o processo pode remover componentes inibitórios pela precipitação, conversão química de compostos tóxicos em formas não tóxicas e /ou adição de alguma substância ao hidrolisado que melhore a capacidade dos microrganismos de fermentá-lo. Ainda de acordo com estes autores, que avaliaram também a remoção de ácido acético, hidroximetilfurfural, furfural e compostos fenólicos após o procedimento de elevação de pH de vários hidrolisados hemicelulósicos, foi possível constatar que neste processo não houve remoção de ácido acético, houve uma diminuição moderada na concentração total

de compostos fenólicos (12%) e uma diminuição significativa no conteúdo de furanos (68%) (HMF e furfural).

5.2 Caracterização farelo de soja

A composição centesimal química do farelo de soja após extrusão e prensagem está apresentada na Tabela 5.3. O farelo de soja foi analisado com relação aos teores de proteínas bruta e solúvel, cinzas, fibra bruta, extrato etéreo, índice de acidez e índice de urease.

Tabela 5.3: Composição química centesimal (g/100g) do farelo de soja.

Análises	Composição centesimal do Farelo de soja
Proteína Bruta (%)	45,01
Proteína Solúvel (%)	82,99
Cinzas (%)	6,44
Fibra Bruta (%)	4,56
Extrato Etéreo (%)	7,77
Índice de acidez (m KOH/ g)	0,59
Índice de urease	0,00

Apesar da utilização do farelo de soja neste trabalho não ser para sua inclusão em dietas humana ou de animais, estas análises foram importantes para determinação da qualidade do farelo de soja empregado neste trabalho. Como base para isto foi importante verificar se o tratamento térmico utilizado durante o processo de extrusão favoreceu a destruição dos fatores antinutricionais presentes no farelo de soja. O processamento térmico é utilizado para aumentar o valor nutricional dos alimentos à base de soja.

Em geral, as condições do processo tais como temperatura, teor de umidade, velocidade da rosca de extrusão, forças de cisalhamento e temperatura de aquecimento determinam a eficiência da inativação de fatores antinutricionais, bem como de constituintes sensíveis ao calor e o grau de desnaturação das proteínas presentes no farelo de soja extrusado e processado. Neste sentido, foram realizadas duas análises importantes: índice da atividade de urease e a solubilidade da proteína em KOH 0,2% (proteína solúvel). Estas análises fornecem informações importantes quanto à redução adequada dos fatores antinutricionais, quanto à manutenção da qualidade da proteína e quanto à quantidade elevada de óleo nos grãos.

O índice de urease é a análise mais comum utilizada para avaliar a qualidade do tratamento do processamento do grão de soja. Este método determina a atividade residual de urease dos produtos de soja como um indicador indireto de destruição dos fatores antinutricionais pelo calor como, por exemplo, inibidores de tripsina, que estão presentes nos grãos. O valor ideal do índice de urease está na faixa de 0,05 a 0,30. Valores excelentes da atividade padrão da atividade ureásica da soja e farelo estão na faixa de 0,01 a 0,05. Neste trabalho foi obtido um índice de urease igual a 0,00 (Tabela 5.3) indicando que o tratamento térmico durante o processo de extrusão do farelo foi adequado.

A solubilidade da proteína em KOH 0,2% está baseada na reação dos grupos amino livres com outros grupos para formar pontes peptídicas, que reduzem a solubilidade da proteína. A soja crua possui solubilidade de proteínas em 100% e, com o aquecimento, a solubilidade diminui, de forma que a solubilidade abaixo de 75% evidencia superaquecimento, sendo ideal um valor maior que 75% e menor que 85%. No entanto, o teor de proteína solúvel encontrado foi de 82,99% (Tabela 5.3) sendo superior a 75% evidenciando que o processo térmico não proporcionou um superaquecimento da soja.

Também observou-se que o farelo não estava totalmente desengordurado apresentando um teor de extrato etéreo de 7,7% (Tabela 5.3). Realmente, durante o processamento deste farelo não houve nenhuma extração da gordura por solventes. Também pode-se observar elevado teor de proteína bruta (45,01%) e boa quantidade de fibra bruta (4,56%). O teor de umidade do farelo de soja foi de 7,87%. O teor de umidade está de acordo com as normas estabelecidas pela EMBRAPA (2008) que diz que o farelo deve apresentar umidade inferior a 12%. Assim, com estas análises, conclui-se que o farelo de soja empregado neste trabalho é de boa qualidade.

5.3 Avaliação da solubilidade da proteína extraída do farelo de soja em hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho

5.3.1. Hidrólise enzimática do farelo de soja

O hidrolisado obtido pela hidrólise enzimática do farelo de soja empregando a enzima alcalase apresentou uma quantidade de proteína solubilizada de 45 g/L. Nas mesmas condições empregadas nesta hidrólise, porém sem a adição da enzima alcalase, obteve-se 22,56 g/L (controle). A Alcalase é uma enzima proteolítica produzida por fermentação submersa com uma cepa selecionada de *Bacillus licheniformis*. O seu principal componente enzimático, a Subtilina A, é uma endoproteinase com temperatura ótima entre 55 e 70 °C e pH ótimo entre 6,0 e 8,0. A Alcalase empregada neste trabalho apresentou atividade específica de 435,6 U/mL.

Este trabalho teve como base a metodologia de hidrólise enzimática do farelo de soja empregando a enzima alcalase desenvolvida por Stenzel (2007). De acordo com esse autor a quantidade de proteína solubilizada de farelo de soja foi de 23,45 g/L, ou seja 47,89% menor do que a quantidade de proteína solubilizada obtida neste trabalho. Este fato pode estar relacionado com a utilização da etapa de autoclavagem antes do uso deste hidrolisado como nutriente para meio de cultivo.

5.3.1.1. Avaliação de interferentes durante a quantificação de proteína de soja em hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho

Durante a avaliação da solubilidade da proteína extraída do farelo de soja em hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho foi utilizado o método de Lowry. Este método, apesar de apresentar grande sensibilidade para proteínas, o mesmo possui algumas desvantagens, como estar sujeito a muitos interferentes (ZAIA, 1998). Os interferentes mais comuns são compostos fenólicos, lipídios, detergentes, ácido úrico, guanina e xantina, sulfato de amônio, melanina, bilirrubina, 4-metilumbeliferona, mercaptanas e cisteína, tampão tris-HCL, açúcares e RNA (ZAIA, 1998).

Desta forma, antes da realização da avaliação da solubilidade da proteína do farelo de soja em hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho foi importante verificar se as amostras continham espécies interferentes. Foram preparadas amostras como descritas pelo método de Lowry. Em um conjunto de amostras foram adicionadas

quantidades conhecidas de proteína (BSA). Estes ensaios foram realizados para amostras de hidrolisado enzimático de farelo de soja (Figura 5.1), hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho nos pH de 4,0, 5,5 e 7,0 (Figura 5.2) e também no hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho adicionado de hidrolisado de farelo de soja nos pH de 4,0, 5,5 e 7,0 (Figura 5.3).

Figura 5.1: Avaliação de interferentes durante a quantificação de proteína em farelo de soja empregando o método de Lowry nas condições: adicionadas de BSA (■) e sem adição de BSA (●).

Fonte: Próprio autor.

Pela Figura 5.1, referente somente a análise de proteína pelo método de Lowry em meio hidrolisado de farelo de soja, observa-se que as curvas apresentaram-se praticamente paralelas com coeficientes angulares de 0,0068 e 0,0065 para as condições sem adição e com adição de proteína BSA, respectivamente. Este comportamento indicou que não há possíveis interferentes na quantificação de proteína pelo método de Lowry neste hidrolisado de farelo de soja.

No entanto, esta mesma análise no meio hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho (Figura 5.2) mostra espécies interferentes, visto que as curvas apresentaram-se não paralelas entre si. Para pH 4,0 observou-se coeficientes angulares de 0,0028 e 0,0037 para as condições sem adição e com adição de proteína BSA, respectivamente. Para a condição de pH 5,5 observou-se coeficientes angulares de 0,0034 e 0,0042 para as condições sem adição e com adição de proteína BSA, respectivamente. Para o pH 7,0 observou-se coeficientes angulares de 0,0029 e 0,0017 para as condições sem adição e com adição de proteína BSA, respectivamente (Figura 5.2).

Similarmente, este comportamento foi observado ao se adicionar hidrolisado de farelo de soja ao hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho, independentemente do pH (Figura 5.3). Neste caso, para pH 4,0 observou-se coeficientes angulares de 0,0036 e 0,0048 para as condições sem adição e com adição de proteína BSA, respectivamente. Para a condição de pH 5,5 observou-se coeficientes angulares de 0,0052 e 0,0023 para as condições sem adição e com adição de proteína BSA, respectivamente. Para o pH 7,0 observou-se coeficientes angulares de 0,0049 e 0,0034 para as condições sem adição e com adição de proteína BSA, respectivamente (Figura 5.3).

Figura 5.2: Avaliação de interferentes durante a quantificação de proteína em hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho empregando o método de Lowry, nas seguintes condições: **A)** pH 4; adicionadas de BSA (■) e sem adição de BSA (●); **B)** pH 5,5; adicionadas de BSA (■) e sem adição de BSA (●); **C)** pH 7,0; adicionadas de BSA (■) e sem adição de BSA (●).

Fonte: Próprio autor.

Figura 5.3: Avaliação de interferentes durante a quantificação de proteína em hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho suplementado com a proteína de farelo de soja empregando o método de Lowry, nas seguintes condições: **A)** pH 4; adicionadas de BSA (■) e sem adição de BSA (●); **B)** pH 5,5; adicionadas de BSA (■) e sem adição de BSA (●); **C)** pH 7,0; adicionadas de BSA (■) e sem adição de BSA (●).

Fonte: Próprio autor.

Assim, foram utilizados controles analíticos para minimizar esses interferentes na avaliação da solubilidade da proteína extraída do farelo de soja em hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho. A Tabela 5.4 mostra a concentração de proteína solúvel em hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho em diferentes valores de pH de acordo com a matriz estatística apresentada na Tabela 4.1.

Os ensaios 01, 03 e 05 foram utilizados como controles analíticos por corresponderem aos ensaios realizados sem a adição de farelo de soja e nos valores de pH 4,0, 7,0 e 5,5, respectivamente (Tabela 5.4). Nos ensaios controles 01, 03 e 05 foram encontrados 4,38 g/L, 5,96 g/L e 5,58 g/L de proteína solubilizada, respectivamente. Os resultados destes ensaios foram utilizados para corrigir a concentração de proteína solúvel nos hidrolisados hemicelulósicos de sabugo de milho adicionados da proteína extraída de farelo de soja nas condições de valores de pH semelhantes.

Tabela 5.4: Solubilização da proteína de farelo de soja em hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho em diferentes níveis de pH e com adição de diferentes concentrações de hidrolisado de farelo de soja de acordo com planejamento fatorial 2^2 com fase centrada e 3 repetições no ponto central (Tabela 5.5).

Ensaios	HFS (g/L)	pH	Proteína solúvel e interferente (g/L)	Proteína solúvel após correção com os controles*
1	0,0	4,0	4,38*	0,0
2	5,0	4,0	13,36	8,98
3	0,0	7,0	5,96*	0,0
4	5,0	7,0	14,16	8,20
5	0,0	5,5	5,58*	0,0
6	5,0	5,5	15,53	9,96
7	2,5	4,0	12,79	6,76
8	2,5	7,0	13,21	8,90
9	2,5	5,5	10,74	5,16
10	2,5	5,5	11,74	6,16
11	2,5	5,5	11,28	5,70

* ensaios utilizados como controles analíticos.

5.3.2. Avaliação da solubilidade da proteína extraída do farelo de soja

Foi realizada a análise estatística completa dos resultados obtidos na Tabela 5.5, visando à otimização da solubilidade da proteína de soja solubilizada em hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho. Inicialmente foram realizados os ensaios correspondentes ao planejamento fatorial 2^3 (ensaios 01 ao 04) e as repetições no ponto central (ensaios 09, 10 e 11). A partir da análise estatística destes ensaios (Tabela 5.5), foi constatado que a variável hidrolisado de farelo de soja (HFS) foi significativo a um nível de 99% de confiança. O pH não foi significativo ao nível de 90% de confiança, e a interação HFS x HFS foi significativa a um nível de confiança de 90%.

Nesta etapa constatou-se que o resultado relativo à concentração de proteína de farelo de soja solubilizada em HHSM apresentou curvatura significativa e não apresentou falta de ajuste significativo. Assim, prosseguiu-se a realização dos ensaios correspondentes à face centrada (ensaios 5 a 8) para compor o modelo estatístico.

Tabela 5.5: Matriz para a concentração de proteína solubilizada de farelo de soja, apresentando os níveis codificados e naturais de um planejamento fatorial 2^2 com face centrada e 3 repetições no ponto central.

		Ensaio	HFS [*] (g/L)	pH			[C] [*] (g/L)
			x₁	x₂	x₁	x₂	
Planejamento Fatorial 2 ²	1	0,0	4,0	-1	-1		0,0
	2	5,0	4,0	+1	-1		8,98
	3	0,0	7,0	-1	+1		0,0
	4	5,0	7,0	+1	+1		8,20
Composição do Modelo Face Centrada	5	0,0	5,5	-1	0		0,0
	6	5,0	5,5	+1	0		9,96
	7	2,5	4,0	0	-1		6,76
	8	2,5	7,0	0	+1		8,90
Erro puro Ponto Central	*PC1	2,5	5,5	0	0		5,16
	*PC2	2,5	5,5	0	0		6,16
	*PC3	2,5	5,5	0	0		5,70

^{*}HFS = farelo de soja hidrolisado; [C] = Concentração de proteína de farelo de soja solubilizada; PC1, PC2, PC3 = pontos centrais.

Na Tabela 5.6 encontra-se a análise de variância (ANOVA) depois de retiradas as variáveis não significativas ao nível de 90 e 95% de confiança. A Tabela 5.7 apresenta os coeficientes de regressão das variáveis independentes mantidas no modelo e o nível de significância dos coeficientes de regressão da equação representativa do modelo proposto, com os valores de seus respectivos desvios padrão para a concentração de proteína solubilizada seguindo um planejamento fatorial 2^2 com face centrada e 3 repetições no ponto central.

Tabela 5.6: Análise de variância (ANOVA) para a concentração de proteína solubilizada de Farelo de Soja em hidrolisado seguindo um planejamento fatorial 2^3 com face centrada e 3 repetições no ponto central.

Fatores e interações	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado médio	Valor de F	Valor de p
HFS	122,76	1	122,76	89,33	0,0001
pH	0,31	1	0,31	0,22	0,6502
HFSxHFS	11,05	1	11,05	8,04	0,0252
Erro total	9,62	7	1,37	-	-
Total	143,24	10			
$R^2=0,93$				R^2 (ajustado)=0,90	

Tabela 5.7: Coeficiente de Regressão, Erros-Padrão e valor de p do modelo estatístico para a concentração de proteína solubilizada em hidrolisado de sabugo por seguindo um planejamento fatorial 2^2 com face centrada e 3 repetições no ponto central.

Variáveis Independentes	Coeficiente de Regressão	Erros-Padrão	Valor de p
Constante	6,53600	0,52	0,0002
HFS	4,52333	0,48	0,0001
pH	0,22667	0,48	0,6502
HFSxHFS	-2,01267	0,71	0,0252
$R^2=0,93$		R^2 (ajustado)=0,90	

Foi realizada uma análise de variância (ANOVA), que utiliza o método do ajuste do mínimo quadrado, incluindo as médias quadráticas e as interações de 2ª ordem, para testar se a equação de regressão era estatisticamente significativa. Como pode ser observado pela Tabela 5.6 o nível de significância para os fatores e interações se encontra em 95% de confiança, indicando que o F estimado foi maior que o F Tabelado. Assim, tem-se a evidência da existência de uma relação quadrática dos fatores e interações (variáveis independentes) com a variável resposta que é a concentração de proteína solúvel no HHSM, indicando que foi estatisticamente significativo, com bom intervalo de confiança.

Com relação ao coeficiente de determinação (Tabela 5.8) foi possível constatar que 93 % da variação total em torno da média foi explicada pela regressão. O valor de p da análise de variância do modelo foi menor que 0,01; indicando que, estatisticamente, existe uma relação entre as variáveis ao nível de 99% de confiança.

Tabela 5.8: Análise de variância para o ajuste de um modelo quadrático aos dados da Tabela 5.6, que representa a concentração de proteína solubilizada de farelo de soja em hidrolisado de sabugo.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor de F	Valor de p
Modelo	134,12	3	44,71	32,53	0,0002
Resíduos	9,62	7	1,37	-	-
Falta de ajuste	9,12	5	1,82	7,28	0,1252
Erro puro	0,50	2	0,25	-	-
Total (corr.)	143,24	10			
$R^2 = 0,93$			R^2 (ajustado) = 0,90		

Após a verificação dos fatores e interações que foram significativas e refinamento do modelo, obteve-se uma equação que representa a concentração da proteína solubilizada de hidrolisado de farelo de soja no HHSM, a partir dos coeficientes de regressão (Tabela 5.7). A Equação (5.1) representa o modelo matemático que visa a maior concentração de proteína solubilizada.

$$Y_1 = 6,53600 + 4,52333 X_1 + 0,22667 X_2 - 2,01267 X_1^2 \quad (5.1)$$

Em que Y_1 corresponde à concentração de proteína solubilizada de farelo de soja (g/L) e X_1 e X_2 correspondem aos valores codificados para as variáveis hidrolisado de farelo de soja (HFS) e pH inicial do hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho, respectivamente.

Observa-se pela Equação (5.1) que para a variável hidrolisado de farelo de soja o efeito deste fator foi positivo. Isto indica que a utilização de seu maior nível (+1) interfere favoravelmente no processo estudado. Após rearranjo dos termos e anulação das derivadas parciais da Equação (5.1) obteve-se um sistema de equações que, ao ser resolvido, resultou os seguintes valores codificados: HFS = 0,95 (aproximando para 1,0) e pH = 0 indicando que o máximo de proteína solubilizada em hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho nestas condições seria de 9,02 g/L.

A equação (5.1) foi utilizada no programa STATISTICA 6.0 com o objetivo de obter a superfície de resposta para o modelo de concentração de proteína solubilizada, e visualizar a tendência de maximização desta resposta. Observa-se pela análise de superfície de resposta da Figura 5.4, que o máximo valor para a concentração de proteína solubilizada de farelo de soja pode ser alcançado empregando a concentração de farelo de soja de 5,0 g/L, ou seja, no seu nível superior e o pH inicial do hidrolisado nos níveis estudados não foi significativo não influenciando na concentração de proteína solubilizada de farelo de soja.

Para a validação do modelo proposto para a concentração de proteína solubilizada, foi realizado um ensaio nas condições determinadas pela metodologia estatística, ou seja, HFS = 1,0 (valor real de 5,0 g/L) e pH = 0 (valor real de 5,5). Experimentalmente foi obtido um valor de 8,48 g/L, similar ao valor mencionado anteriormente de 9,02 g/L, indicando que o modelo pode representar matematicamente a concentração de proteínas solubilizada de farelo de soja em hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho com um coeficiente de determinação de 0,93.

A solubilidade é uma das propriedades mais importantes da proteína de soja, sendo necessário conhecer o seu comportamento em diferentes meios para uma aplicação adequada. Com este estudo foi possível observar a solubilidade da proteína de soja em

hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho. Stenzel (2007) também estudou numa faixa de pH de 4,5 a 7,0 qual seria o melhor pH para a realização da hidrólise enzimática de farelo de soja. Este autor não observou perda significativa de solubilidade nessa faixa de pH estudada. Ströher (2010) estudou a solubilidade da proteína do farelo de soja em néctares de frutas e também observou em seu trabalho que não houve a necessidade de corrigir o pH do meio.

Figura 5.4: Superfície de resposta e curvas de nível do modelo proposto que representa a concentração de proteína solubilizada de farelo de soja em hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho em função das variáveis farelo de soja (FS) e pH inicial do hidrolisado.

Fonte: Próprio autor.

5.4 Processos fermentativos

5.4.1 Avaliação da suplementação nutricional do hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho com proteína de farelo de soja solubilizada

O emprego de diferentes estratégias para suplementação de hidrolisados hemicelulósicos vem sendo estudadas visando alcançar bons resultados para a produção de bioetanol. Estes hidrolisados podem ou não necessitar da suplementação. A otimização da composição do meio de cultura em associação com as condições de fermentação é uma maneira eficaz para o aumento da produtividade em um bioprocessos (PHAM et al., 1998; RATMAN et al., 2005). Em geral, o estudo da suplementação de hidrolisados hemicelulósicos para a produção de bioetanol envolve uma variação de fontes de nitrogênio e sais minerais (NIGAM, 2002; MIYAFUJI et al., 2003).

Neste sentido, para verificar a necessidade da suplementação do hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho para a produção de bioetanol, pela levedura *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054, foi realizado um planejamento fatorial 2^3 com face centrada e 3 repetições no ponto central avaliando as seguintes fontes de nitrogênio: hidrolisado de farelo de soja (HFS), sulfato de amônio (SA) e uréia (U).

Na Tabela 5.9 estão apresentados os níveis reais das variáveis correspondendo às concentrações utilizadas de cada nutriente nos ensaios fermentativos. Encontram-se também, os resultados referentes ao consumo de açúcares (xilose e glicose), produção de etanol, crescimento celular e glicerol em hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho com 120 h de cultivo. Nestas condições, observou-se que a concentração celular atingiu valores 14 vezes maiores que seu valor inicial (1,5 g/L), independentemente da fonte de nitrogênio utilizada nos ensaios (Tabela 5.9). A suplementação de hidrolisados hemicelulósicos empregados como fonte de carbono em bioprocessos pode ser minimizada, desde que estes contenham, além do substrato, componentes essenciais para o crescimento das células (PREZIOSI-BELLOY; NOLLEAU; NAVARRO, 2000).

No entanto, o consumo de açúcares apresentou valores maiores que 70% em condições suplementadas com todas as fontes de nitrogênio (ensaios 08 e 14). Estes ensaios, 08 e 14, foram realizados com o hidrolisado de farelo de soja mantido em seu nível superior (5,0 g/L) e com redução concomitante das outras duas fontes de nitrogênio em 50% do seus níveis máximos (6,0 g/L). Nos ensaios 04 e 13 foram mantidos os

mesmos níveis de uréia e sulfato de amônio empregados nos ensaios 08 e 14, respectivamente (Tabela 5.9), porém sem a suplementação com hidrolisado de farelo de soja. Estes ensaios 04 e 13 apresentaram redução no consumo de açúcares em 44,9% e 34,1% com relação aos ensaios 08 e 14, respectivamente. Este fato mostra que o consumo de açúcares pela levedura *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054 em hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho foi favorecido com a suplementação com hidrolisado de farelo de soja em associação com as outras fontes de nitrogênio (uréia e sulfato de amônio) (Tabela 5.9).

A máxima produção de etanol (5,51 g/L) foi obtida no ensaio 14, suplementado com uréia (3 g/L), sulfato de amônio (3 g/L) e hidrolisado de farelo de soja (5,0 g/L). O subproduto glicerol, durante os ensaios, foi produzido em baixas concentrações (entre 0,11 e 0,33 g/L) porém correspondeu a 4,5% e 31,9% quando comparado com a maior (ensaio 14) e menor (ensaio 03) produção de etanol, respectivamente. No geral, a formação de glicerol foi favorecida com a suplementação de hidrolisado de farelo de soja, independentemente da suplementação com uréia e ou sulfato de amônio (Tabela 5.9).

O hidrolisado de farelo de soja é uma fonte alternativa de nitrogênio devido ao seu alto teor de proteína e à sua disponibilidade como subproduto da indústria de extração de óleo de soja. Uma vantagem do farelo de soja é o seu baixo custo, levando em conta que o custo do meio de cultura é um fator muitas vezes decisivo em processos de bioconversão. É muito importante definir a necessidade mínima da suplementação nutricional para a bioconversão empregando hidrolisados hemicelulósicos (MUSSATO; ROBERTO, 2005).

Tabela 5.9: Consumo de açúcares, produção de etanol, células e glicerol por *S. stipitis* CBS 6054 em frascos agitados contendo meio hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho após 120h á 30 °C e pH 5,5 suplementado de acordo com planejamento fatorial apresentado na (Tabela 5.5).

Ensaio	Variáveis (g/L)			Consumo de açúcares (%)	Etanol* (g/L)	Produção de células (g/L)	Glicerol* (g/L)
	U*	SA*	HFS*				
01	0,0	0,0	0,0	29,80	0,93	24,95	0,18
02	6,0	0,0	0,0	45,98	0,94	32,36	0,18
03	0,0	6,0	0,0	32,18	0,47	20,77	0,15
04	6,0	6,0	0,0	38,95	1,24	22,18	0,11
05	0,0	0,0	5,0	37,05	1,13	33,83	0,33
06	6,0	0,0	5,0	68,54	2,17	36,84	0,26
07	0,0	6,0	5,0	42,54	1,38	29,58	0,33
08	6,0	6,0	5,0	70,70	2,42	33,37	0,21
09	0,0	3,0	2,5	46,35	1,77	32,73	0,23
10	6,0	3,0	2,5	53,64	2,17	33,70	0,21
11	3,0	0,0	2,5	65,40	2,69	39,14	0,27
12	3,0	6,0	2,5	44,92	1,90	29,95	0,19
13	3,0	3,0	0,0	47,03	1,67	28,46	0,15
14	3,0	3,0	5,0	71,38	5,51	34,70	0,25
15	3,0	3,0	2,5	50,24	2,65	34,69	0,19
16	3,0	3,0	2,5	50,81	3,15	33,57	0,21
17	3,0	3,0	2,5	50,53	2,90	31,29	0,25

*HFS= Farelo de Soja; SA=Sulfato de Amônio; U=Ureia.

Na Tabela 5.10 encontram-se os valores de concentração de ácido acético, condutividade e pH do meio de fermentação, para os ensaios referentes à matriz estatística (Tabela 5.9). Observa-se que o ácido acético foi quase que totalmente consumido em todos os ensaios (Tabela 5.10). O decréscimo da concentração do ácido pode ter sido em função de seu consumo como fonte de carbono durante o processo fermentativo. Visto que no metabolismo de xilose e glicose em leveduras tem-se a formação de piruvato que é convertido irreversivelmente a acetil-CoA ou acetaldeído. Este último é convertido a acetato na presença do cofator NAD^+ , o qual pode ser convertido a acetil CoA e seguir para o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (HAHAN-HÄGERDAL et al., 1994).

Tabela 5.10: Concentração de ácido acético, condutividade e pH do meio de fermentação, para os ensaios referentes à matriz estatística (Tabela 4.2).

Ensaio	Variáveis (g/L)			Ácido Acético (g/L)		pH		Condutividade (mS/cm)	
	U	SA	HFS	t _{inicial}	t _{final}	t _{inicial}	t _{final}	t _{inicial}	t _{final}
01	0,0	0,0	0,0	2,56	0,0	5,50	6,99	8,40	6,60
02	6,0	0,0	0,0	2,75	0,0	5,59	7,03	8,40	6,92
03	0,0	6,0	0,0	2,68	0,0	5,53	7,26	11,81	9,04
04	6,0	6,0	0,0	2,79	0,0	5,59	7,16	11,70	9,29
05	0,0	0,0	5,0	2,41	0,12	5,49	7,10	8,80	7,31
06	6,0	0,0	5,0	2,63	0,15	5,55	6,96	8,80	8,01
07	0,0	6,0	5,0	2,84	0,0	5,51	7,34	12,32	10,26
08	6,0	6,0	5,0	2,49	0,10	5,53	7,11	13,68	11,36
09	0,0	3,0	2,5	2,39	0,0	5,53	7,35	11,18	9,05
10	6,0	3,0	2,5	2,41	0,0	5,64	7,20	10,73	8,32
11	3,0	0,0	2,5	2,50	0,05	5,56	7,14	8,66	7,10
12	3,0	6,0	2,5	2,20	0,0	5,59	7,55	13,85	11,46
13	3,0	3,0	0,0	2,36	0,0	5,61	7,28	10,49	7,74
14	3,0	3,0	5,0	2,27	0,08	5,58	6,68	10,91	8,92
15	3,0	3,0	2,5	2,29	0,0	5,59	7,29	10,80	8,61
16	3,0	3,0	2,5	2,29	0,0	5,59	7,29	10,80	8,41
17	3,0	3,0	2,5	2,65	0,0	5,56	7,03	10,52	8,41

Durante os ensaios fermentativos foi observada variação de pH entre 5,5 a 7,5 unidades (Tabela 5.10). Essa variação de pH para valores acima de 7,0 pode ter desfavorecido a produção de etanol, com favorecimento do crescimento celular durante os ensaios fermentativos (Tabela 5.9). Resultado semelhante foi encontrado por Cabral et al. (2009), em seu estudo sobre a influência do pH na produção de etanol, em que foi constatado que o aumento demasiado do pH favoreceu a produção de células em detrimento da produção de etanol. Estes autores também observaram que em pH próximo de 7,0 ocorreu máxima conversão de substrato em células, e mínima conversão de substrato em produto. Estes autores encontraram que o melhor valor de pH para um elevado $Y_{p/s}$ estava entre valores de pH 4 a 6. Enquanto valores maiores de pH proporcionaram diminuição no valor $Y_{p/s}$ e aumento no valor de $Y_{x/s}$. Estes resultados são similares aos encontrados na Tabela 5.11 em que observa elevados fatores de conversão de

açúcares em células ($Y_{x/s}$) e baixos fatores de conversão de açúcares em etanol ($Y_{p/s}$). Os máximos valores de $Y_{p/s}$ e $Y_{x/s}$ foram de 1,13 g_{células}/g_{açúcares} e 0,228 g_{etanol}/g_{açúcares} (ensaio 14) (Tabela 5.11). Neste ensaio a produtividade volumétrica em etanol foi de 0,0458 g_{etanol}/L.h. Estes baixos valores de $Y_{p/s}$ poderiam estar relacionados com o suprimento de oxigênio no meio de fermentação. Neste momento, é importante salientar que *S. stipitis* requer pequenas quantidades de oxigênio para máxima conversão de xilose a etanol (BENNETZEN et al., 1982). Pouco etanol é formado sob condições estritamente anaeróbias (JEFFRIES, 1983). A explicação para este efeito do oxigênio poderia residir em atividade mais elevada de sua XR pelo cofator NADPH. A XDH tem especificidade pelo cofator NADH, assim acúmulo parcial de NADP e NADH provavelmente ainda possa ocorrer, apesar da atividade da XR ser dependente de NADH em *S. stipitis* (LIGHTHEL et al., 1988). Atividades de duas enzimas chaves fermentativas, piruvato descarboxilase (PDC) e ADH, são induzidas quando *S. stipitis* se encontra em condição limitada do oxigênio e a produção de etanol aumenta (PASSOTH et al., 1996). Entretanto, pouco se sabe sobre este processo em *S. stipitis*, a níveis moleculares e fisiológicos. Uma melhor compreensão de regulação metabólica dos genes envolvidos no metabolismo fermentativo de xilose é essencial para futuros avanços neste campo (SHI et al., 2002).

Tabela 5.11: Parâmetros fermentativos da bioconversão de açúcares em etanol ($Y_{p/s}$) e de açúcares em células ($Y_{x/s}$) por *S. stipitis* CBS 6054 em frascos agitados contendo meio hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho após 120 h á 30 °C e pH 5,5 suplementado de acordo com planejamento fatorial apresentado na (Tabela 5.5).

Ensaio	$Y_{x/s}$ *	$Y_{p/s}$ *
	(g/g)	(g/g)
01	2,22	0,085
02	1,61	0,048
03	1,57	0,037
04	1,28	0,074
05	2,41	0,082
06	1,20	0,072
07	1,85	0,088
08	1,06	0,081
09	1,71	0,101
10	1,47	0,117
11	1,33	0,141
12	1,66	0,153
13	1,42	0,107
14	1,13	0,228
15	1,65	0,156
16	1,58	0,209
17	1,47	0,183

* $Y_{p/s}$ = fator de conversão de xilose em etanol; $Y_{x/s}$ = fator de conversão de xilose em células.

Com relação à condutividade elétrica (Tabela 5.10) observou-se que os meios contendo sulfato de amônio apresentaram valores de condutividade sempre mais baixos (em torno de 8,4 mS/cm), independentemente da presença da suplementação com ureia e ou hidrolisado de farelo de soja. Este fato se deve provavelmente à dissociação do sulfato de amônio liberando no meio seus íons. MARKOU et al. (2013) estudaram o efeito de quatro ácidos (H_2SO_4 , HNO_3 , HCl e H_3PO_4) na sacarificação de biomassa enriquecida de carboidratos de *Cyanobacterium Arthrospira platensis* visando a produção de bioetanol a partir deste hidrolisado. Cada ácido foi utilizado em quatro diferentes concentrações (2,5 N, 1 N, 0,5 N e 0,25 N) e temperaturas (40 °C, 60 °C, 80 °C e 100 °C). Os hidrolisados foram utilizados como substrato na fermentação etanólica por uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* adaptada ao estresse salino. O fator de conversão em etanol foi

significativamente afetado pela concentração de ácido utilizado na sacarificação dos carboidratos apresentando elevados fatores de conversão em etanol quando o hidrolisado foi produzido com HNO_3 0,5 N e H_2SO_4 0,5 N. Os autores também constatarem uma relação negativa entre a condutividade elétrica do hidrolisado e o fator de conversão em etanol, a qual diminuiu em função do aumento da condutividade elétrica do hidrolisado. No geral, em todos os ensaios ocorreram decréscimos nos valores da condutividade elétrica em torno de 20 % com relação aos seus valores iniciais de condutividade (Tabela 5.10).

5.4.1.1 Análise da resposta fator de conversão de açúcares em etanol ($Y_{P/S}$)

Foi realizada a análise estatística completa dos ensaios apresentados na Tabela 5.12, visando à otimização do fator de conversão de açúcares em etanol. Inicialmente foram realizados os ensaios correspondentes ao planejamento fatorial 2^3 (ensaios 01 a 08) e 3 repetições no ponto central (ensaios 15, 16 e 17), visando a otimização do fator de conversão de açúcares em etanol (Tabela 5.12). A partir da análise estatística destes ensaios foi constatado que a variável hidrolisado de farelo de soja foi significativa a um nível de 95% de confiança, enquanto que o sulfato de amônio e a ureia não foram significativos ao nível de 90% de confiança, mas as interações U x U e SA x SA apresentaram um nível de confiança de 90%.

Nesta etapa constatou-se que os resultados relativos ao fator de conversão de açúcares em etanol apresentaram curvatura significativa e não apresentavam falta de ajuste significativo. Assim, prosseguiu-se a realização dos ensaios correspondentes à face centrada (ensaios 9 a 14) para compor o modelo estatístico para o fator de conversão de açúcares em etanol.

Na Tabela 5.13 encontra-se a análise de variância (ANOVA) para o fator de conversão de açúcares em etanol depois de retiradas as variáveis não significativas ao nível de 90 e 95% de confiança (HFS^2 , U x HFS e SA x HFS). Os fatores principais U e SA foram mantidos no modelo devido as suas interações (U x U e SA x SA) terem sido significativas ao nível de 90% de confiança. A Tabela 5.14 apresenta os coeficientes de regressão das variáveis independentes mantidas no modelo e os níveis de significância dos coeficientes de regressão da equação representativa do modelo proposto, com os valores de seus respectivos desvios padrão para o fator de conversão de açúcares em etanol seguindo um planejamento fatorial 2^3 com face centrada e 3 repetições no ponto central.

Tabela 5.12: Matriz para o fator de conversão de açúcares em etanol por *S. stipitis* apresentando os níveis codificados e naturais de um planejamento fatorial 2^3 com face centrada e 3 repetições no ponto central.

Ensaio		U*	SA*	HFS*				Y _{p/s}
		(g/L)	(g/L)	(g/L)	x ₁	x ₂	x ₃	(g/g)
		x ₁	x ₂	x ₃				
Planejamento Fatorial 2^3	1	0,0	0,0	0,0	-1	-1	-1	0,085
	2	6,0	0,0	0,0	+1	-1	-1	0,048
	3	0,0	6,0	0,0	-1	+1	-1	0,037
	4	6,0	6,0	0,0	+1	+1	-1	0,074
	5	0,0	0,0	5,0	-1	-1	+1	0,082
	6	6,0	0,0	5,0	+1	-1	+1	0,072
	7	0,0	6,0	5,0	-1	+1	+1	0,088
	8	6,0	6,0	5,0	+1	+1	+1	0,081
Composição do Modelo Face Centrada	9	0,0	3,0	2,5	-1	0	0	0,101
	10	6,0	3,0	2,5	+1	0	0	0,117
	11	3,0	0,0	2,5	0	-1	0	0,141
	12	3,0	6,0	2,5	0	+1	0	0,153
	13	3,0	3,0	0,0	0	0	-1	0,107
	14	3,0	3,0	5,0	0	0	+1	0,228
Erro puro Ponto central	PC1	3,0	3,0	2,5	0	0	0	0,156
	PC2	3,0	3,0	2,5	0	0	0	0,209
	PC3	3,0	3,0	2,5	0	0	0	0,183

* Y_{p/s} = fator de conversão de açúcares em etanol; HFS= Farelo de Soja; SA=Sulfato de Amônio; U=Ureia.

Tabela 5.13: Análise de variância (ANOVA) para o fator de conversão de açúcares em etanol seguindo um planejamento fatorial 2^3 com face centrada e 3 repetições no ponto central.

Fatores e interações	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado médio	Valor de F	Valor de p
U	8,100E-008	1	8,100E-008	1,169E-004	0,9916
SA	2,025E-006	1	2,025E-006	2,922E-003	0,9579
HFS	4,052E-003	1	4,052E-003	5,85	0,0341
UxU	0,016	1	0,016	22,73	0,0006
SxAxSA	3,527E-003	1	3,527E-003	5,09	0,0454
Erro total	7,624E-003	11	6,931E-004	-	-
Total	0,048	16			
$R^2=0,84$				R^2 (ajustado)=0,77	

Tabela 5.14: Coeficiente de Regressão, Erros-Padrão e valor de p do modelo estatístico para o fator de conversão de açúcares em etanol seguindo um planejamento fatorial 2^2 com face centrada e 3 repetições no ponto central.

Variáveis Independentes	Coeficiente de Regressão	Erros-Padrão	Valor de p
Constante	0,17789	0,011	0,0004
U	-9,000E-005	8,325E-003	0,9916
SA	4,500E-004	8,325E-003	0,9579
HFS	0,020130	8,325E-003	0,0341
UxU	-0,072124	0,015	0,0006
SxAxSA	-0,034124	0,015	0,0454
$R^2=0,84$		R^2 (ajustado)=0,77	

Na Tabela 5.15 encontra-se a análise de variância de ajuste do modelo quadrático aos dados da Tabela 5.13. O resíduo total foi desmembrado em falta de ajuste e erro puro. Este procedimento é válido uma vez que foram realizadas as repetições no ponto central para poder obter uma estimativa do erro aleatório (erro puro). Assim, pode-se julgar de maneira quantitativa se o modelo representa satisfatoriamente as observações.

Com relação ao coeficiente de determinação (Tabela 5.15) foi possível constatar que 84% da variação total em torno da média é explicada pela regressão, ficando 16% com os resíduos. O valor de p da análise de variância do modelo foi menor que 0,01; indicando que estatisticamente existe uma relação entre as variáveis ao nível de 99% de confiança.

Tabela 5.15: Análise de variância para o ajuste de um modelo quadrático aos dados da Tabela 5.13, que representa o fator de conversão de xilose em etanol.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado Médio	Valor de F	Valor de p
Modelo	0,041	3	8,138E-003	11,74	0,0004
Resíduos	7,624E-003	11	6,931E-004	-	-
Falta de ajuste	6,219E-003	9	6,910E-004	0,98	0,6000
Erro puro	1,405E-003	2	7,023E-004	-	-
Total (corr.)	0,048	16			
$R^2 = 0,84$			R^2 (ajustado) = 0,77		

Após a verificação dos fatores e interações que foram significativas e refinamento do modelo, obteve-se uma equação que representa o fator de conversão de açúcares em etanol, a partir dos coeficientes de regressão (Tabela 5.14). A Equação (5.2) representa o modelo matemático que visa à otimização do fator de conversão dos açúcares em etanol dentro da região de estudo (níveis avaliados).

$$Y_1 = 0,17789 - 0,00009 X_1 + 0,020130 X_2 - 0,072124 X_1^2 \quad (5.2)$$

Em que Y_1 corresponde ao fator de conversão de açúcares em etanol (g/g) e X_1 , X_2 correspondem aos valores codificados para as variáveis, uréia e hidrolisado de farelo de soja, respectivamente. Na geração desta equação, o sulfato de amônio teve seu nível codificado fixado no ponto central.

Observa-se pela Equação (5.2) que para a variável hidrolisado de farelo de soja (X_2) o efeito foi positivo. Isto indica que a utilização de seu maior nível (+1) interfere favoravelmente no processo estudado. Deve-se mencionar que sulfato de amônio (SA) e a ureia (U) não foram significativos ao nível de 90% de confiança.

Para a validação do modelo proposto para o fator de conversão de açúcares a etanol foi realizado um ensaio nas condições nutricionais determinadas pela metodologia

estatística, ou seja, 3,0 g/L para o sulfato de amônio (nível 0), 3,0 g/L para a ureia (nível 0) e 5,0 g/L para o hidrolisado de farelo de soja (nível +1). Com a substituição dos valores codificados na Equação (5.2), obteve-se um valor estimado para o fator de conversão de açúcares em etanol de 0,20 g/g. Também foi possível pelo *software Design-Expert*, estimar, nesta condição otimizada para o fator de conversão de açúcares em etanol, a produção de etanol (3,89 g/L) e produtividade volumétrica (0,03 g/L.h). Experimentalmente foi obtido um valor de 0,18 g/g indicando que o modelo pode representar matematicamente o fator de conversão de açúcares em etanol, com um coeficiente de determinação de 0,84. A Figura 5.5 refere-se ao ensaio da comprovação do modelo, mostrando o perfil de crescimento celular, consumo de açúcares e produção de etanol durante a fermentação em hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho pela levedura *S. Stipitis*. Nestas condições, obteve-se consumo de açúcares de 63%, produtividade volumétrica de etanol foi de 0,03 g/L.h, eficiência de conversão (η) de 44% e produção máxima de etanol de 3,47 g/L. Estes resultados foram similares aos estimados pelo *Software Design-Expert*.

Figura 5.5: Perfil de crescimento celular (●), consume de açúcares (▲) e produção de etanol (■) durante a fermentação em hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho pela levedura *S. stipitis* nas condições nutricionais determinadas pela metodologia estatística.

Fonte: Próprio autor.

A Equação (5.2) foi utilizada no programa STATISTICA 6.0 com o objetivo de se obter a superfície de resposta para o modelo do fator de conversão de açúcares em etanol, e visualizar a tendência de maximização desta resposta. Observa-se pela análise de superfície de resposta, da Figura 5.6, que o máximo valor para o fator de conversão de açúcares em etanol pode ser alcançado empregando-se a concentração de farelo de soja de 5,0 g/L e uréia em 3,0 g/L, ou seja, nos seus níveis superior e ponto central, respectivamente.

Figura 5.6: Superfície de resposta e curvas de nível do modelo proposto que representa o fator de conversão de açúcares em etanol ($Y_{p/s}$) em hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho por *S. stipitis* em função das variáveis farelo de soja (FS) e Ureia (U).

Fonte: Próprio autor.

6. CONCLUSÃO

Com relação à obtenção do hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho por hidrólise ácida para uso como substrato na bioconversão de etanol por *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054 conclui-se que:

- A condição de hidrólise ácida empregada favoreceu a remoção da fração hemicelulósica (88,05%) com pouca alteração na celulose (10,06%) e lignina (27,07%) com relação ao material *in natura* proporcionando um hidrolisado hemicelulósico rico em xilose (28,30 g/L) com baixas concentrações de compostos fenólicos e furanos.
- O tratamento do hidrolisado hemicelulósico após a etapa de concentração a vácuo além de contribuir para remoção de compostos fenólicos e furanos com remoção parcial de ácido acético proporcionou redução no seu teor proteico com relação ao hidrolisado concentrado (74,76%) bem como em relação ao hidrolisado original (28,53%).

Com relação à qualidade do farelo de soja em função de seu tratamento térmico concluiu-se que:

- O tratamento térmico empregado durante a extrusão do farelo de soja não proporcionou superaquecimento (solubilidade da proteína em KOH igual a 82,99%) e foi adequado para a destruição de fatores antinutricionais (índice de uréase igual a 0,00) produzindo um farelo de soja de boa qualidade.

Com relação à obtenção do hidrolisado de farelo de soja via hidrólise enzimática conclui-se que:

- A hidrólise enzimática do farelo de soja com a enzima Alcalase 2,4 L FG (Novozymes Latin American LTDA) forneceu um hidrolisado com elevado teor proteico (45 g/L). Em relação ao processo somente com extração aquosa da proteína obteve-se 22,56 g/L (controle).

Com relação á avaliação da solubilidade da proteína de farelo de soja obtida por hidrólise enzimática em hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho conclui-se que:

- Foi necessário levar em consideração na quantificação de proteína pelo método de Lowry a presença de espécies interferentes no hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho.
- A máxima solubilização da proteína de soja (9,01 g/L) em hidrolisado hemicelulósico de sabugo foi obtida maximizando a concentração de hidrolisado de farelo de soja (5,0 g/L). O pH nos níveis estudados não influenciou na solubilização da proteína de soja em hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho.

Com relação à avaliação da suplementação do hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho com a proteína solubilizada de farelo de soja em associação ou não com outros nutrientes (uréia e sulfato de amônia) na obtenção de bioetanol por *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054 conclui-se:

- O crescimento celular e a formação de glicerol foram favorecidos com a suplementação de hidrolisado de farelo de soja independentemente da suplementação com uréia e ou sulfato de amônio.
- O consumo de açúcares pela levedura *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054 em hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho foi favorecido com a suplementação com hidrolisado de farelo de soja em associação com as outras fontes de nitrogênio (ureia e sulfato de amônio).
- Pela análise de superfície de resposta, o máximo valor para o fator de conversão de açúcares em etanol (0,20 g/g.) pode ser alcançado empregando-se hidrolisado de farelo de soja em seu nível superior (5,0 g/L) e uréia (3 g/L) e sulfato de amônio em seus pontos centrais.

7. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

- Os ensaios fermentativos apresentaram elevados crescimentos celulares com baixas produções de etanol. Para otimizar esta produção sugere-se um estudo detalhado no suprimento de oxigênio.
- Os resultados deste trabalho indicaram que a produção de etanol por *Scheffersomyces stipitis* CBS 6054 em hidrolisado hemicelulósico foi favorecida com o aumento da concentração do hidrolisado de farelo de soja. No entanto, o aumento fora dos níveis estudados neste trabalho contribuirá para diluição dos açúcares presentes no hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho. Desta forma, para que se possa verificar se realmente esse aumento irá favorecer essa bioconversão de açúcares em etanol sugeriu-se preparar isolados proteicos de soja (pó) para futuros estudos.

REFERÊNCIAS

- ABERT, T.; KNEIFEL, W. Physicochemical and functional properties of casein hydrolysates obtained by treatment with different enzymes. **IDF**, pp. 97-105, 1993.
- ADACHI, S.; KIMURA, K.; MATSUNO, R. et al. Separation of peptide groups with definite characteristics from enzymatic protein hydrolysate. **Agricultural Biological Chemische**, v. 45, p. 925-932, 1991.
- ADLER-NISSEN, J. Procesamiento enzimático de las proteínas alimenticias. **Alimentos**, v. 6, p. 29-33, 1981.
- ADLER-NISSEN J. **Enzymic hydrolysis of food proteins**. p 110-169, 1986. New York: Elsevier Applied Science Publishers.
- AGBOGBO, F.; COWARD-KELLY, G. Cellulosic ethanol production using the naturally occurring xylose fermenting yeast, *Pichia stipitis*. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 9, p. 1515-1524, 2008.
- AGUILAR, R.; RAMÍREZ, J.A.; GARROTE, G.; VÁSQUEZ, M.. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. **Journal of Food Engineering**, v. 55 n. 4, p 309-318, 2002.
- ALVES, L.A. **Tratamento do hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar para produção biotecnológica de xilitol**. 100p, 1997. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Faculdade de Engenharia Química de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 1997.
- AMARTEY, S.; JEFFRIES, T. W. Comparison of corn steep liquor with other nutrients in the fermentation of D-xylose by *Pichia stipitis* CBS 6054. **Biotechnology Letters**, y. 16, n. 2, p. 211-214, 1994.
- ANWAR, F; BHANGER, M.I; YASMEEN, S. Antioxidant activity of some natural extracts in corn oil. in MURATA, N; YAMADA, M.; NISHIDA, I; OKUYAMA, H.; SEKIYA, J.; HAJIME, W. (Eds.). **Advanced research of plant lipids**, 24-27, Kluwer Publishers, 2003.
- AOAC. Official Methods of Analysis. **Association of Analytical Chemists**. 16th ed. Maryland, 1997.
- AOAC. Official Methods of Analysis. **Association of Analytical Chemists**. 14th ed. Washington, DC, 1984.
- AOAC. Official Methods of Analysis. **Association of Analytical Chemists**. 12th ed. Washington, D.C., 1975.
- ARABA M. AND N. M. DALE. Evaluation of protein solubility as an indicator of overprocessing of soybean meal. **Poultry Science**, v.69, p. 76-83, 1990.
- ASTM D 1106-56, Standard test method for acid insoluble lignin in wood, 1996.

AVICULTURA INDUSTRIAL. **Breve introdução sobre o processo de extração mecânica de óleo e produção de farelo de soja.** Disponível em: <
https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=3&cad=rja&uact=8&ved=0CCsQFjAC&url=http%3A%2F%2Ffile.aviculturaindustrial.com.br%2FMaterial%2FTecnico%2F2012%2Fartigo_farelo_soja.doc&ei=t1v7U8KaA9bMsQTCOYHoBw&usg=AFQjCNGmhq9278QLX_X7SJE9zTNk5Trs8w&bvm=bv.73612305,d.cWc>.
 Acesso em 23 de setembro de 2014.

BASTOS, V.D. Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias. **BNDES Setorial**, n 25, p. 5-38, 2007.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, E. R. **Como fazer experimentos**. 3 ed. Editora Unicamp, 2007.

BAZINET, L.; LAMARCHE, R.; TOUPIN, R.; BOULET, M.; IPPERSIELL, D. Electroacidification of soybean for production of isolate. **Food Technology**, v. 51, n. 9, p. 52-60, 1997.

BINOD, P.; SINDHU, R.; SINGHANIA, R. R.; VIKRAM, S., DEVI, L.; NAGALAKSHMI, S.; KURIEN, N.; SUKUMARAN, R. K.; PANDEY, A. Bioethanol production from rice straw: an overview. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4767-4774, 2010.

BISARIA, V.S.; GHOSE, T.K. Biodegradation of cellulosic materials: substrates, microorganisms, enzymes and products. **Enzymes and Microbial Technology**, v.3, p. 90-103, 1981.

BRITO, F. **Bioprodução de etanol de hidrolisado de bagaço de cana utilizando diferentes formas de operação do bioprocesso**. 2000. Dissertação de Tese (Mestrado). Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químico e Bioquímicos da Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil, 2000.

BRITO, C.O.; ALBINO, L.F.T.; ROSTAGNO, H.S. et al. Adição de complexo multienzimático em dietas à base de soja extrusada e desempenho de pintos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, p.457-461, 2006.

BRUINENBERG, P.M.; DEBOT, P.H.M.; VANDIJKEN, J.P.; SCHEFFERS, W.A. NADH-Linked aldose reductase – the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 4, p. 256-260, 1984.

BUTOLO, J.E. Qualidade de ingredientes na alimentação animal. **Colegio Brasileiro De Nutricao Animal**, p. 430, 2002.

CANILHA, L.; CARVALHO, W.; FELIPE, M.A.; ALMEIDA E SILVA, J.; GIULIETTI, M. Ethanol production from sugarcane bagasse hydrolysate using pichia stipitis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 161, n. 1, p. 84-92, 2010.

CARDONA, C.A.; QUINTERO, J.A.; PAZ, I.C. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 13, p. 4754-4766, 2010.

CARREIRA, R.L.; JUNQUEIRA, R.G.; MOTTA, S.; SILVESTRE, M.P.C. Emprego da cromatografia líquida de alta eficiência hidrofílica na determinação dos aminoácidos de hidrolisados de caseína, **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 22, n.3, pp. 229-232, 2002.

CARVALHEIRO, F.; DUARTE, L.C.; LOPES, S.; PARAJÓ, J.C.; GÍRIO, F.M. Evaluation of the detoxification of brewery's spent grain hydrolysate for xylitol production by *debaryomyces hansenii* ccmi 941. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 1215-1223, 2005.

CHANDEL, A.K.; KAPOOR, R.K.; SINGH, A.; KUHAD, R.C. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 10, p. 1947-1950, 2007.

CHANG, V.; NAGWANI, M.; HOLTZAPPLE, M. Lime pretreatment of crop residues bagasse and wheat straw. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 74, n. 3, p. 135-159, 1998.

CHANG, V.; NAGWANI, M.; KIM, C.-H.; HOLTZAPPLE, M. Oxidative lime pretreatment of high-lignin biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 94, n. 1, p. 1-28, 2001.

CLEMENTE, A. Enzymatic protein hydrolysates in human nutrition. **Trends in Food Science & Technology**, v. 11, p. 254-262, 2000.

COMPÊNDIO DE ALIMENTAÇÃO ANIMAL. **Sindirações**, 204p, 2005.

CORREIA, E. **Mercado de gasolina**: impacto da introdução dos veículos flex-fuel. Resumo Estratégico Petrobrás, Julho, 2005.

CUZENS, J.C.; MILLER, J.R. Acid hydrolysis of bagasse for ethanol production. **Renewable Energy**, v. 2/3, n. 10, p. 285-290, 1997.

DALL'AGNOL, A.; ROESSING, A.C.; LAZZAROTTO, J.J.; HIRAKURI, M.H.; OLIVEIRA, A. **O Complexo Agroindustrial da Soja Brasileira**, Londrina: Embrapa Soja. 2007. 12 p. (Embrapa Soja. Circular Técnica 43). Disponível em: <http://www.aprosoja.com.br/novosite/downloads/EMBRAPA_Complexo_Industrial_da_Soja_%202007.pdf>. Acesso em: 19 de setembro de 2014.

DIEN B.S.; COTTA, M.A.; JEFFRIES, T.W. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 63, n. 3, p. 258-266, 2003.

DUARTE, A.J.; CARREIRA, R.L.; JUNQUEIRA, R.G.; COELHO, J.V.; SILVESTRE, M.P.C. Propriedades emulsionantes e solubilidade da caseína bovina e de seus hidrolisados tripticos. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 18, n. 3, pp. 302-308, 1998.

DU PREEZ, J.C. Process parameters and environmental factors affecting Dxylose fermentation by yeasts. **Enzyme and Microbiology Technology**, v. 16, p. 944-952, 1994.

DU PREEZ, J.C.; BOSCH, M.; PRIOR, B.A. Xylose fermentation by *Candida shehatae* and *Pichia stipitis*: effects of pH, temperature and substrate concentration. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 8, p. 360-364, 1986.

EKEN-SARAÇOGLU, N.; ARSLAN, Y. Comparison of different pretreatments in ethanol fermentation using corn cob hemicellulosic hydrolysate with *pichia stipitis* and *candida shehatae*. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 855-858, 2000.

EMBRAPA, EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUARIA. **Tecnologia de produção de soja região central do brasil**. 2008 Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/SojanoBrasil.htm>>. Acesso em: 19 set. 2014.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Maise in human nutrition**. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/T0395E/T0395E00.htm>>. Acesso em: 02 out. 2014.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood: chemistry, ultrastructure, reactions**. P. 610. Walter de Gruyter, 1989.

FESTEL, G. W. Biofuels - Economic aspects. **Chemical Engineering & Technology**, v. 31, n. 5, p. 715-720, 2008.

FOLEY, K.M.; VANDER-HOOVEN, D.I.B. Properties and industrial uses of corncobs. In: POMERANZ, Y.; MUNCK, L. **Cereals a renewable resource**. The American Association of Cereal Chemists, 1981.

GARCIA, M. C.; TORRE, M.; MARINA, M. L.; LABORDA, F. Composition and characterization of soybean and related products. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v.37, n.4, p.361-391, 1997.

GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Isoflavones in soy based foods consumed in Brazil: levels, distribution, and estimated intake. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 5987 - 5993, 2002.

GOLDEMBERG, J.; NIGRO, F. E. B.; COELHO, S. T. **Bioenergia no estado de São Paulo: situação atual, perspectivas, barreiras e propostas**. Imprensa Oficial do Estado de São Paulo, 2008.

GOLDSTEIN, I. S. **Organic chemicals from Biomass**. CRC Press, 1981, p. 309.

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

HERRERA, A.J.; TÉLLEZ-LUIS, S.J.; RAMÍREZ, J.A.; VÁSQUEZ, M. Production of xylose from sorghum straw using hydrochloric acid. **Journal of Cereal Science**, v. 37, p. 267-274, 2003.

IEA – International Energy Agency. **Climate change**. Disponível em: <<http://www.iea.org/topics/climatechange/>> Acesso em 23 set. 2014.

ISHIHARA, T.; MATSUO, J.; ITO, M.; NISHIGUCHI, H.; TAKITA, Y. Porous HZSM-5 zeolite tube as a novel application of catalyst for the synthesis of ethanol by hydration of ethylene. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 36, n. 10, p. 4427-4429, 1997.

JEFFRIES, T.W.; GRIGORIEV, I.V.; GRIMWOOD, J.; LAPLAZA, J.M.; AERTS, A.; SALAMOV, A.; SCHMUTZ, J.; LINDQUIST, E.; DEHAL, P.; SHAPIRO, H.; JIN, Y.; PASSOTH, V.; RICHARDSON, P. M. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. **Nature biotechnology**, v. 25, n.3, p.319-326, 2007.

JEFFRIES, T. W.; LIGHTFOOT, E. N.; FADY, J. H; Effect of glucose supplements on the fermentation of xylose by *Pachsolon tannophilus*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 27, p. 171-176, 1985.

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

JOSÉ A.H.M; RODRIGUES RCLB. **Obtenção de hidrolisado hemicelulósico de sabugo de milho por hidrólise ácida para produção de xilitol por *Candida guilliermondii* FTI 20037**. EEL, 2013. Relatório de iniciação científica – PIBIC.

KARIMI, K.; EMTIAZI, G.; TAHERZADEH, M.J. Production of ethanol and mycelial biomass from rice straw hemicellulose hydrolyzate by *Mucor indicus*. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 3, p. 653-658, 2006.

KELLY, C.; JONES, O.; BARNHART, C.; LAJOIE, C. Effect of furfural, vanillin and syringaldehyde on *Candida guilliermondii* growth and xylitol biosynthesis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 148, n. 1-3, p. 97-108, 2008.

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

KOHLHEPP, Gerd. Análise da situação da produção de etanol e biodiesel no Brasil. **Estud. av.**, v. 24, n. 68, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-40142010000100017&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 01 Out. 2014.

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

LIMA, U.A.; BASSO, L.C.; AMORIM, H.V. Produção de etanol. **Biotechnologia industrial**. Blucher, 2001, v. 3, p. 1-39.

LIU, B. L.; TZENG, Y. M. Optimization of growth medium for the production of spores from *Bacillus thuringiensis* using response surface methodology. **Process Biochemistry**. v. 18, p. 413-418, 1998.

LOHMEIER-VOGEL, E.M.; SOPHER, C.R.; LEE, H. Intracellular acidification as a mechanism for inhibition by acid hydrolysis-derived inhibitors of xylose fermentation by yeasts. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 20, p. 75-81, 1998.

MANNHEIM, A.; CHERYAN, M. Enzyme-Modified Proteins from Corn Gluten Meal: Preparation and Functional Properties. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 69, p. 1163-1169, 1992.

MANTHA, D.; BASHA, Z. A.; PANDA, T. Optimization of medium composition by response surface methodology for the production of tartaric acid by *Gluconobacter suboxydans*. **Bioprocess Engineering**, v. 19, p. 285-288, 1998.

MARKOU, G.; ANGELIDAKI, I.; NERANTIZIS, E.; GEORGAKAKIS, D. Production by carbohydrate-enriched biomass of *arhrospira (spirulina) plantensis*. **Energies**, v. 6, p. 3937-3950, 2013.

MARTINEZ, A.; RODRIGUEZ, M.E.; YORK, S.W.; PRESTON, J.F.; INGRAM, L.O. Effects of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ treatments (“overliming”) on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 69, n. 5, p. 526-536, 2000.

MATSUOKA, S.; FERRO, J.; ARRUDA, P. The Brazilian experience of sugarcane ethanol industry. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 45, n. 3, p. 372-381, 2009.

MATSUSHIKA, A.; INOUE, H.; KODAKI, T.; SAWAYAMA, S. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, n. 1, p. 37-53, 2009.

MIYAFUJI, H.; DANNER, H.; NEUREITER, M.; THOMASSER, C.; BVOCHORA, J.; SZOLAR, O.; BRAUN, R. Detoxification of wood hydrolysate with wood charcoal for increasing the fermentability of hydrolysates. **Enzyme and Technology**, v. 32, p. 396-400, 2003.

MOHAGHEGHI, A.; EVANS, K.; CHOU, Y.C.; ZHANG, M. Cofermentation of glucose, xylose, and arabinose by genomic DNA-integrated xylose/arabinose fermenting strain of *Zymomonas mobilis* AX101. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 98–100, p. 885–898, 2002.

MOUSDALE, D.M. **Biofuels: biotechnology, chemistry and sustainable development**; CRC Press, 2008.

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

NOVACANA. **Senado aprova lei que possibilita percentual maior de etanol na gasolina**. Disponível em: <<http://www.novacana.com/n/etanol/mercado/futuro/senado-aprova-lei-maior-etanol-gasolina-020914/>>. Acesso em 23 set. 2014.

NIGAM, J.N. Bioconversion of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to motor fuel ethanol by xilose-fermenting yeast. **J. of Biotechnology**, v.97, p. 107-116. 2002.

NGUYEN, N.H.; SUH, S.-O.; MARSHALL, C.J.; BLACKWELL, M. Morphological and ecological similarities: wood-boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts, *Spathaspora passalidarum* gen. sp. nov. and *Candida jeffriesii* sp. nov. **Mycological Research**, v. 110, n. 10, p. 1232-1241, 2006.

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

ORDÓÑEZ, J.A.; RODRÍGUEZ, M.S.C.; ÁLVAREZ, L.F.; SANZ, M.L.G.; IGUILLÓN, G.D.G.F.; PERALES, L.H.; CORTECERO, M.D.S. Tecnología de alimentos: componentes dos alimentos e processos. **Editora Artmed**, 2005, v. 1, p. 294.

PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. Biotechnological potencial of agro-industrial residues. **Bioresources Technology**, v. 74, p. 69-80, 2000.

PARISI, F. Advances in lignocellulosics hydrolysis and in the utilization of the hydrolysates. **Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology**, v. 38, p. 53-87, 1989.

PALMQVIST, E.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 17-24, 2000.

PARAJÓ, J.C.; DOMÍNGUEZ, H.; DOMÍNGUEZ, J. Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. **Bioresouce Technology**, v. 66, n. 1, p. 25-40, 1998.

PEARCE, R.J. Food functionality success or failure for dairy based ingredients. **Aust. J. Dairy Technol.**, v. 50, n. 1, p. 15-23, 1995.

PHAM, P. L.; TAILLAMDIER, P.; DELMAS, M.; STREHAIANO, P. Optimization of a culture medium for xylanase production by *Bacillus* sp. Using statistical experimental design. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 14, p. 185-190, 1998.

PINTADO, J.; GONZÁLEZ, M. P.; MURADO, M. A. Interactions between pretreatment and nutrient concentrations of citric acid production. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 20, p. 544-549, 1997.

PERRY, L.; SANDWEISS, D.H.; PIPERNO, D.R.; RADEMAKER, K.; MALPASS, M.A.; UMIRE, A. VERA, P. Early maize agriculture and interzonal interaction in southern Peru. **Nature**, v. 440, p. 76-79, 2006.

PRASAD, S.; SINGH, A.; JOSHI, H. C. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. **Resources Conservation and Recycling**, v. 50, n. 1, p. 1-39, 2007.

PREZIOSI-BELLOY, L.; NOLLEAU, V.; NAVARRO, J. M. Xylitol production from aspenwood hemicellulose hydrolysate by *Candida guilliermondii*. **Biotechnology Letters**, y. 22, p. 239-243, 2000.

PULS J.; SCHUSEIL J. Chemistry of hemicelluloses: relationship between hemicellulose structure and enzymes required for hydrolysis. In: COUGHLAN, M.P.; HAZLEWOOD, G.P. (editors). **Hemicellulose and Hemicellulases**. Portland Press; p. 1-27, 1993.

RAMOS, L.P. Aproveitamento integral de resíduos agrícolas e agroindustriais. In: **Seminário nacional sobre reuso/reciclagem de resíduos sólidos industriais**. 2000. Cetesb, 2000.

RAJ, T; KAPOOR, M; GAUR, R; CHRISTOPHER, J; LAMBA, B; TULI, D.K; KUMAR, R. Physical and chemical characterization of various indian agriculture residues for biofuels production. **Energy and Fuels**, v. 29, p. 3111-3118, 2015.

RAO, K. J.; KIM, C. H.; RHEE, S. K. Statistical optimization of medium for the production of recombinant hirudin from *Saccharomyces cerevisiae* using response surface methodology. **Process Biochemistry**, v. 35, p. 639-647, 2000.

REED, G. Enzymes in Food Processing. **2nd ed. Academic Press**, p. 573, 1975.

ROBERTO, I. C.; SATO, S.; MANCILI-IA, I. M.; TAQUEDA. M. E. S. Influence of media composition on xylitol fermentation by *Candida guilliermondii* using response surface methodology. **Biotechnology Letters**. v. 17, n. 11, p. 1223-1228, 1995.

ROBERTO, I.C.; MANCILHA, I.M.; SOUZA, C.M.A.; FELIPE, M.G.A.; SATO, S.; CASTRO, H.F. Evaluation of rice straw hemicellulose hydrolysate in the production of xylitol by *Candida guilliermondii*. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 11, p. 1211-1216, 1994.

ROBERTO, I.C.; LACIS, L.C.; BARBOSA, M.F.S.; MANCILHA, I.M. Utilization of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Pichia stipitis*, for the production of ethanol. **Process Biochemistry**, v. 26, p. 15-21, 1991.

ROBERTO, I. C.; MUSSATTO, S. I.; RODRIGUES, R. Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor. **Industrial Crops and Products**, v. 17, n. 3, p. 171-176, 2003.

RODRÍGUEZ-CHONG, A.; RAMÍREZ, J.A.; GARROTE, G.; VÁZQUEZ, M. Hydrolysis of sugar cane bagasse using nitric acid: a kinetic assessment. **Journal of Food Engineering**, v. 61, p. 143-152, 2004.

RODRIGUES, RCLB. **Influência da disponibilidade de O₂ no processo descontínuo de obtenção de xilitol em hidrolisado de bagaço de cana**. 246 p, 2005. Tese (doutorado). Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, 2005.

SERERP – SECRETARIA DO REGISTRO E REDAÇÃO PARLAMENTAR. **MPV – Medida Provisória, Nº 647 de 2014**. Disponível em: <http://www.senado.gov.br/atividade/materia/detalhes.asp?p_cod_mate=117939>. Acesso em 23 set. 2014.

SEAB – SECRETARIA DE ESTADO DA AGRICULTURA E DO ABASTECIMENTO. **Soja – Análise da Conjuntura Agropecuária**. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/deral/Prognosticos/soja__2014_15.pdf>. Acesso em 01 set. 2014.

SHI, N.Q.; CRUZ, J.; SHERMAN, F.; JEFFRIES, T.W. Sham-sensitive alternative respiration in the xylose-metabolizing yeast *pichia stipitis*. *Yeasts*, v. 19, p. 3937-3950, 2013.

SILVA, J.P.A. **Estudo da produção de etanol por *Pichia stipitis* empregando hidrolisado de palha de arroz**. 2007. 144p. Dissertação (Mestrado) Escola de Engenharia de Lorena, 2007.

SILVA, J.P.; CARNEIRO, L.M.; ROBERTO, I.C. Treatment of rice straw hemicellulosic hydrolysates with advanced oxidative processes: a new and promising detoxification method to improve the bioconversion process. **Biotechnology Biofuels**, v. 6, n. 23, p. 1-13, 2013.

SILVA, J.P.; MUSSATTO, S.; ROBERTO, I.C. The influence of initial xylose concentration, agitation, and aeration on ethanol production by *Pichia stipitis* from rice straw hemicellulosic hydrolysate. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 5, p. 1306–1315, 2010.

SILVA, J.G.; MORAIS, H.A.; SILVESTRE, M.P.C. Comparative study of the functional properties of bovine globin isolates and sodium caseinate. **Food Res. Inter.**, v. 36, n. 1, p. 73-80, 2003a.

SILVA, J.G.; MORAIS, H.A.; SILVESTRE, M.P.C. Evaluating the incorporation of globin bovine and sodium caseinate on the raw better quality and on the stability of ham pâté. **Meat Sci.**, v. 63, n. 2, p. 177-184, 2003b.

SILVA, J.G.; SILVESTRE, M.P.C. Functional properties of bovine plasma intended for use as a functional ingredient in human food. **Food Sci. Technol.**, v. 37, n. 6, pp. 709-718, 2003c.

SIMONETTI, M. O grão milagroso. In:_____. **Soja: uma caminhada sem fim: como a soja conquistou o mundo e o Brasil**. 1999, p. 34 – 36. Fundação Cargill.

SLININGER, P. J.; DIEN, B. S.; GORSICH, S. W.; LIU, Z. L. Nitrogen source and mineral optimization enhance D-Xylose conversion to ethanol by the yeast *Pichia stipitis* NRRL Y-7124. **Applied Microbial and Cell Physiology**, v. 72, p. 1285-1296, 2006.

SLININGER, P.J.; BOTHAST, R.J. Optimum pH and temperature conditions for xylose fermentation by *Pichia stipitis*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 35, p. 727–731, 1990.

SOLOMONS, T. W. G.; FRYHLE, C.B. **Química orgânica**, v. 1, 8 Ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005.

STENZEL, M. **Solubilização enzimática de proteína do farelo de soja e caracterização funcional dos hidrolisados formados**. 136 p., 2007. Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Maringá, 2007.

STENZEL, M; GIRATA, AK; PEREIRA, NC; ZANIN, GM; LIMA, OCM. Influência das partículas na solubilização enzimática da proteína do Farelo de Soja. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 31, n. 2, p. 195-200, 2009.

STRÖHER, R. Hidrólise Enzimática da proteína de farelo de soja. 74 p., 2010. Dissertação (mestrado), Universidade Estadual de Maringá, 2010.

SULTANA, B.; ANWAR, F.; PRZYBYLSKI, R. Antioxidant potencial of corncob extracts for stabilization of corn oil subjected to microwave heating. **Food Chemistry**, v. 104, p. 997 – 1005, 2007.

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

SUNITHA. K.; LEE, J. K.; OH, T. K. Optimization of medium components for phytase production by *E. coli* using response surface methodology. **Bioprocess Engineering**, v.21, p. 477-481, 1999.

SUNITHA, K.; RAO, M. V. S.; AVYANNA. C. Optimization of medium constituents and fermentation conditions for the production of L-Glutamic acid by the co immobilized whole cells. **Bioprocess Engineering**, y. 18, p. 353-359, 1998.

TOMME, P; WARREN, R.A.J.; GILKES, N.R. Cellulose hydrolyses by bacteria and fungi, In: **Advances in microbial physiology**. Poole, R.K. (Ed), p 1-81, London Academic Press, 1995, p 1-81, ISBN 0-12-027737-9.

TORO, M.A.N.; GARCÍA-CARRENO, F.L. Evaluation of the progress of protein hydrolysis In: WHITAKER, J. (Prefácio) **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**. Davis: John Wiley & Sons, Inc., Unidade B2.2. 1-14, 2002.

UCLA – UNIVERSITY OF CALIFORNIA, LOS ANGELES. **Lowry protein assay protocol** (from Scott Hisieh). 2007 Disponível em: <http://www.chem.ucla.edu/dept/Faculty/merchant/pdf/Lowry_Assay.pdf>. Acesso em: 13 fev. 2015

ÚNICA – UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA-DE-AÇÚCAR. **Usina pioneira de etanol celulósico coloca brasil entre líderes globais no uso da nova tecnologia**. Disponível em: < <http://www.unica.com.br/noticia/29810917920343378786/usina-pioneira-de-etanol-celulosico-coloca-brasil/> >. Acesso em: 01 out. 2014.

van VLEET, J.H.; JEFFRIES, T.W. Yeast metabolic engineering for hemicellulosic ethanol production. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 3, p. 300-306, 2009.

VIEIRA, C. R. **Extração, hidrólise e remoção de fenilalanina das proteínas de farinha de arroz**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) –Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.

WINKELHAUSEN, E.; KUZMANOVA, S. Microbial conversion of xylose to xylitol. **Jornal of fermentation and bioengineering**, v. 86, n. 1, p. 1-14, 1998.

WYMAN, C. E. Ethanol from lignocellulosic biomass -technology, economics, and opportunities. **Bioresource Technology**, v. 50, n. 1, p. 3-16, 1994.

WYMAN, C. E. Biomass ethanol: technical progress, oportunites, and comercial challenges. **Annu Rev. Energy Environ**, v. 24, p. 189-226, 1999.

ZAIA, A. M. D.; ZAIA, V. B. T.C.; LICHTIG, J.; Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos metodos existentes. **Química Nova**, v. 21, n. 6, 1998.

ZALDIVAR, J.; NIELSEN, J.; OLSSON, L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 56, n. 1-2, p. 17-34, 2001.

ZALDIVAR, J.; MARTINEZ, A.; INGRAM, L. O. Effect of alcohol compounds found in hemicellulose hydrolysate on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 68, n. 5, p. 524-530, 2000.