



CONVERSÃO ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Fotos cedidas pelos autores

Aplicação da biotecnologia enzimática na conversão de resíduos da indústria de alimentos

Introdução

Os resíduos agro-industriais são abundantes e podem ser utilizados para produção de glicose e de produtos derivados (Gacesa & Hubble, 1991). No Brasil, obtêm-se os mais diversos subprodutos e resíduos agro-industriais, como é o caso do

partir da celulose contida nesse bagaço (Camargo, 1990).

Há diversas maneiras pelas quais essa celulose pode ser transformada em açúcares livres: ação de ácidos, bases, compostos oxidantes, microrganismos ou enzimas. A degradação biológica da celulose consiste em uma hidrólise enzimática catalisada por celulasas que são amplamente produzidas por fungos e bactérias (Barrichelo & Brito, 1985). Khandke et al. (1989) relatam que a celulose é degradada por um complexo de enzimas composto essencialmente por endocelulase, exocelulase e β -glicosidase. No entanto, para possibilitar a transformação enzimática da celulose para glicose, o bagaço deve ser previamente tratado por algum tipo de processo químico ou físico. A cristalinidade, a área superficial específica, o grau de polimerização e a adsorção de celulase sobre o substrato sólido de celulose são para Ryu & Lee (1992) importantes parâmetros que governam a hidrólise desse polímero. A resistência à hidrólise que a natureza estrutural da maioria dos resíduos celulósicos apresenta pode, segundo Sales et al. (1987), ser parcialmente superada com algum tipo de tratamento físico, químico ou biológico para melhorar seu aproveitamento, sendo que um dos processos mais antigos empregados para deslignificar esses resíduos consiste em umidificá-los com solução de hidróxido de sódio. Menezes et al. (1976) e Menezes et al. (1991) relatam que o tratamento alcalino de compostos ligno-celulósicos aumentou a sua digestibilidade, tornando o substrato predisposto à ação

TERNO DE MOENDAS EM USINA DE AÇÚCAR



Figura 1 - Linha de moagem de cana-de-açúcar com formação do bagaço

Claudio Lima Aguiar

Pesquisador do Laboratório de Bioquímica - Faculdade de Engenharia de Alimentos - Universidade Estadual de Campinas. claguiar@yahoo.com.br

Tobias José Barreto Menezes

Professor Doutor - Departamento de Agroindústria, Alimentos e Nutrição - Universidade de São Paulo. tmenezes@mpc.com.br

bagaço de cana-de-açúcar. Em decorrência da produção do álcool etílico e do açúcar cristal a partir da cana-de-açúcar, avalia-se que, da quantidade de bagaço processado (Figura 1) e utilizado para alimentar caldeiras, haja um excedente correspondente a 8% nas destilarias anexas e 12% nas autônomas, que poderia ser empregado na hidrólise de açúcares, como glicose, a

Tabela 1: Variáveis independentes no planejamento fatorial 2³

| Causas de variação | Níveis | |
|-------------------------------------|-------------|------------|
| | Baixo | Alto |
| A: celulase-bagaço | 7,0 EGU/g/g | 28 EGU/g/g |
| B: tipo de bagaço | BC1 | BC2 |
| C: presença de β -glicosidase | 0,0 UI/g/g | 2,8 UI/g/g |

Foram considerados os extratos enzimáticos comerciais: celulase de *T. viride* (atividade enzimática expressa em unidade de endo-glucanase, EGU/g) e β -glicosidase de *A. niger* (UI/g), por grama de bagaço, em base seca. Os tipos de bagaços analisados foram: BC1 – bagaço lavado e moído e, BC2 – bagaço tratado com solução de hidróxido de sódio a 4%, ácido fosfórico e vapor.

de enzimas celulolíticas. Para Menezes & Hennies (1991), o tratamento do bagaço de cana com hidróxido de sódio potencializou a síntese da celulase de *Aspergillus niger* utilizada na hidrólise de resíduos celulósicos, indicando uma maior exposição da celulose devido ao efeito deslignificante do tratamento alcalino. Lee et al. (1995) utilizando materiais lignocelulósicos, alcançaram porcentagens de hidrólise de 60 a 70%, com atividade enzimática de 20 U/g celulose. Menezes & Hioshii (1982) obtiveram 35% de hidrólise do bagaço de cana tratado a 121°C com solução de hidróxido de sódio a 4%, e porcentagens inferiores a 10% foram alcançadas com bagaço tratado com álcali sem aquecimento. O tratamento do bagaço de cana com solução de hidróxido de cálcio a 2% aumentou a susceptibilidade da celulose ao ataque enzimático por linhagens de *Aspergillus* sp. (Gupte & Madamwar, 1997). Van Walsum et al. (1996) utilizaram

um tratamento com água (220°C, 5 MPa e 120 s) para acondicionar bagaço de cana, predispondo as fibras celulósicas à hidrólise enzimática e simultânea fermentação alcoólica.

Segundo Dueñas et al. (1995) a razão de celulase: β -glicosidase de 1:2 foi favorável para a hidrólise da celulose. Esses autores relatam que a interação sinérgica de *Trichoderma reesei* e *Aspergillus phoenicis* em fermentação submersa promoveu uma eficiência maior de degradação lignocelulolítica do que o uso único de *T. reesei*, provavelmente devido à interação complementar das celulases do *T. reesei* e β -glicosidase do *A. phoenicis* para completa hidrólise do bagaço de cana. Para Latif et al. (1995), a razão de celulase para β -glicosidase deveria ser 1:1,5 para que a hidrólise da celulose a açúcares fermentescíveis seja mais eficiente. Mes-Hartree et al. (1987), utilizando 5% de celulose comercial, alcançaram cerca de 52% de conversão do

substrato em açúcares redutores, sendo 45,5% de glicose, quando utilizaram celulase total de *Trichoderma barzia-num* E58 com uma atividade de 15 U/g celulose a 45°C por 48 horas de incubação.

Neste trabalho, o potencial de hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar tratado e não tratado foi então avaliado pela utilização do extrato fúngico em comparação com o preparado comercial de *Trichoderma viride*, complementado ou não com preparado comercial de β -glicosidase.

Material e métodos

O microrganismo utilizado foi *Aspergillus niger* IZ-09, o qual foi desenvolvido e mantido em meio Czapek-Dox, por aproximadamente, sete dias em estufa a 30°C.

As enzimas empregadas foram: uma preparação comercial de celulase de *Trichoderma viride* e uma preparação comercial de β -glicosidase de *Aspergillus niger*, fornecidas pela Novo Nordisk e um extrato bruto de celulase obtido em laboratório, a partir do cultivo de *Aspergillus niger* IZ-9 em meio de Mandels-Weber (1969) com papel de filtro como fonte de carbono. Uma atividade enzimática de celulase (expressa em Unidades de EndoGlucanase, EGU) foi definida como aquela que libera um micromol de glicose por minuto a 50°C.

Foram utilizados dois tipos de bagaço de cana-de-açúcar: o sem tratamento químico (BC1) e o bagaço tratado

Tabela 2: Comparação de médias de hidrólise da celulose do bagaço de cana

| Tratamento | EGU/g/g bagaço | Tipo de bagaço | UI β -glicosidase/g/g bagaço | Conversão (%)* |
|------------|----------------|----------------|------------------------------------|--------------------|
| 1 | 7,0 | BC1 | 0,0 | 9,45 ^f |
| 2 | 28,0 | BC1 | 0,0 | 15,91 ^e |
| 3 | 7,0 | BC2 | 0,0 | 25,66 ^d |
| 4 | 28,0 | BC2 | 0,0 | 46,41 ^b |
| 5 | 7,0 | BC1 | 2,8 | 11,27 ^f |
| 6 | 28,0 | BC1 | 2,8 | 15,91 ^e |
| 7 | 7,0 | BC2 | 2,8 | 35,71 ^c |
| 8 | 28,0 | BC2 | 2,8 | 59,50 ^a |

* Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente pelo teste de Tukey a 1%. D.M.S. (1%) = 3,33; D.M.S. (5%) = 2,49.

Tabela 3: Efeito dos diferentes tratamentos sobre a porcentagem de hidrólise da celulose de bagaço de cana-de-açúcar

| Tratamentos | Porcentagem de hidrólise (%)* | | | |
|-------------|-------------------------------|------|------|------|
| | 0 b | 24 b | 48 b | 72 b |
| 1 | 0,0 | 7,9 | 9,5 | 9,5 |
| 2 | 0,0 | 14,0 | 15,1 | 16,1 |
| 3 | 0,0 | 17,3 | 22,2 | 26,1 |
| 4 | 0,0 | 32,6 | 40,7 | 47,3 |
| 5 | 0,0 | 9,9 | 11,1 | 11,3 |
| 6 | 0,0 | 14,2 | 16,1 | 16,1 |
| 7 | 0,0 | 22,9 | 32,1 | 36,4 |
| 8 | 0,0 | 39,6 | 53,0 | 59,5 |

* As concentrações de celulose e glicose foram expressas em miligramas por mililitro, e os valores medidos após 72 horas de incubação a 50°C e agitação rotativa de 100 rpm

com hidróxido de sódio a 4%, ácido fosfórico e vapor d'água. O tratamento foi conduzido pesando-se 100 g do bagaço de cana lavado e moído, que foi autoclavado (121°C; 30 minutos) com 2000 mL de solução de hidróxido de sódio a 4%. O material recuperado após filtração, foi neutralizado com ácido fosfórico e seco em estufa a 65°C até massa constante. Ao bagaço obtido foi adicionado à mesma quantidade de água destilada, autoclavado em seguida a 121°C por 30 minutos. A suspensão foi filtrada e o material sólido seco a 65°C até massa constante. O bagaço assim obtido foi denominado BC2.

A conversão enzimática foi avaliada a partir de um planejamento fatorial constituído de 2³ tratamentos, com três repetições. Para esse experimento,

foram consideradas a influência de três variáveis: proporção celulose-bagaço (A), tipo de bagaço (B) e presença de β -glicosidase (C). Os níveis adotados são mostrados na Tabela 1. Todos os experimentos foram conduzidos a 50°C e agitação circular de 100 rpm.

Os resultados foram analisados empregando-se o programa SANEST - Sistema de Análise Estatística para Computadores (Zonta & Machado, 1992), e aplicando-se o teste de Tukey para comparação das médias da hidrólise da celulose presente no bagaço de cana. Finalmente a conversão da celulose em açúcares redutores, expressa em porcentagem, foi determinada adicionando-se aos Erlenmeyer de 250 mL, 5 g de bagaço (ms.), 40 mL de água destilada, 10 mL de solução-tampão

Tabela 4: Formação de glicose durante a hidrólise da celulose de bagaço de cana-de-açúcar

| Tratamentos | Concentração (mg/mL)* | |
|-------------|-----------------------|---------|
| | Celulose | Glicose |
| 1 | 16,7 | 1,84 |
| 2 | 15,4 | 3,10 |
| 3 | 24,3 | 8,96 |
| 4 | 17,1 | 16,20 |
| 5 | 16,3 | 2,20 |
| 6 | 15,4 | 3,10 |
| 7 | 20,8 | 12,50 |
| 8 | 12,5 | 20,80 |

* As concentrações de celulose e glicose foram expressas em miligramas por mililitro, e os valores medidos após 72 horas de incubação a 50°C e agitação rotativa de 100 rpm

citrato de sódio 1 mM (pH 4,8) e a quantidade correspondente de cada extrato enzimático segundo a Tabela 1. Os frascos foram incubados em agitador rotativo a 100 rpm a temperatura de 50°C, por 24 horas. O teor de açúcares redutores foi medido no sobrenadante segundo o método de Miller (1959). A celulose foi determinada segundo o método espectrofotométrico descrito por Updegraff (1969).

Resultados e discussão

As maiores porcentagens de hidrólise foram alcançadas com bagaço de cana tratado, o que evidencia que o tratamento físico e químico foi necessário para um melhor aproveitamento do conteúdo celulósico do bagaço, sem o qual o seu uso diretamente na forma encontrada nas usinas seria impedido (Menezes & Hio-shii, 1982; Barrichelo & Brito, 1985; Sales et al., 1987; Van Walsum et al., 1996 e Gupte & Madamwar, 1997). O tratamento com NaOH, H₃PO₄ e vapor proporcionou maior suscetibilização da celulose à hidrólise enzimática, resultando em maiores conversões em açúcares redutores do que apenas a moagem do bagaço.

Pela Tabela 2, pode-se verificar que o tratamento 8 propiciou maior porcentagem de hidrólise quando foram aplicados sobre o bagaço de cana tratado níveis mais elevados de celulase e β -glicosidase.

Na Tabela 3, foram apresentadas as porcentagens de hidrólise obtidas em três intervalos de tempo considerados para o estudo, ou seja, 24, 48 e 72 horas. Pode-se observar que há um aumento gradual na porcentagem de hidrólise do material celulósico com formação de açúcares redutores, independente do tratamento empregado, muito embora em alguns a conversão da celulose tenha sido mais acentuada. O perfil de formação de açúcares redutores, na forma de glicose, pode ser observado na Tabela 4, na qual está representada a redução da concentração de celulose com aumento consecutivo da concentração de glicose. Da mesma forma que a

Tabela 3, o aumento na conversão é percebido em todos os tratamentos efetuados.

A relação celulase-bagaço foi um importante fator que influenciou na hidrólise dos bagaços, atingindo, aproximadamente, o dobro da conversão quando foi usado em nível elevado para celulase (28,0 EGU/g de bagaço) e bagaço tratado (BC2). A adição de β -glicosidase, além da celulase, foi igualmente importante para potencializar a hidrólise da celulose. Utilizando bagaço de cana sem tratamento, a presença da β -glicosidase não foi estatisticamente significativa. Cuskey et al. (1983) e Tsuneda & Thorn (1995) relataram que a associação da celulose com lignina reduz a acessibilidade do complexo enzimático, o que poderia explicar a baixa eficiência da β -glicosidase em bagaço sem tratamento prévio.

Dentro das condições em que foi desenvolvido o experimento, pode-se concluir que o extrato fúngico de celulase, quando utilizado com a mesma potência, teve comportamento semelhante à preparação comercial. Entre os tratamentos utilizados, destacou-se aquele com solução de hidróxido de sódio a 4%, ácido fosfórico e vapor. A adição de β -glicosidase aumentou a porcentagem de hidrólise. Pelos resultados obtidos pelas análises estatísticas, o tratamento 8 (28,0 EGU/g de celulase, 2,8 UI/g de β -glicosidase e bagaço tratado), foi o que promoveu maior hidrólise da celulose, com valor médio de 59,5%.

Referências bibliográficas

- BARRICHELO, L. E. G.; BRITO, J. O. **Química da madeira**. Piracicaba: Centro Acadêmico "Luiz de Queiroz", 1985. 126 p.
- CAMARGO, C. A. Perfil do setor. In: Conservação de energia na indústria do açúcar e do álcool: manual de recomendação. São Paulo: IPT, 1990. Cap. 2, p. 5-16.
- CUSKEY, S. M.; MONTENECOURT, B. S.; EVENLEIGH, D. E. Screening for cellulolytic mutants. In: WISE, D. L. (Ed.) **Liquid Fuel Development**. New York: CRC Press, 1983. Cap. 2, p. 31-48.
- DUEÑAS, R.; TENDERDY, R. P.; GU-TIERREZ-CORREA, M. Cellulase production by mixed fungi in solid-substrate fermentation of bagasse. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, p. 333-337, 1995.
- GACESA, P.; HUBBLE, J. The enzymatic treatment of waste materials. In: MARTIN, A. M. (Ed.) **Bioconversion of waste materials to industrial products**. London: Elsevier Applied Science, 1991. cap. 2, p. 39-61.
- GUPTA, A.; MADAMWAR, D. Solid state fermentation of lignocellulosic waste for cellulase and beta-glucosidase production by cocultivation of *Aspergillus ellipticus* and *Aspergillus fumigatus*. **Biotechnology Progress**, v. 13, n. 2, p. 166-169, 1997.
- KHANDKE, K. M.; VITHAYATHIL, P. J.; MURTHY, S. K. Purification of xylanase, β -glucosidase, endocellulase and exocellulase from a thermophilic fungus, *Thermoascus aurantiacus*. **Archives of Biochemistry**, p. 491-500, 1989.
- LATIF, F.; RAJOKA, M. I.; MALIK, K. A. Production of cellulases by thermophilic fungi grown on *Leptochloa fusca* straw. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 11, n. 3, p. 343-348, 1995.
- LEE, D.; YU, A. H. C.; SADDLER, J. N. Evaluation of cellulase recycling strategies for the hydrolysis of lignocellulosic substrates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 45, p. 328-336, 1995.
- MANDELS, M.; WEBER, J. The production of cellulases. **Advances in Chemistry Series**, v. 95, p. 391-414, 1969.
- MENEZES, T. J. B.; DE LAMO, P. R.; ARAKAKI, T. Produção do complexo celulolítico C₁, C_x por microrganismos. **Coletânea do ITAL**, v. 7, p. 91-96, 1976.
- MENEZES, T. J. B.; HENNIES, P. T. Influência do pré-tratamento do bagaço de cana-de-açúcar com peróxido alcalino e hidróxido de sódio no sistema celulolítico de *A. niger*. **Coletânea do ITAL**, v. 21, n. 2, p. 213-219, 1991.
- MENEZES, T. J. B.; HIOSHII, S. H. Efeito do tratamento do bagaço de cana na extensão da hidrólise da celulose. **Coletânea do ITAL**, v. 12, p. 123-135, 1982.
- MENEZES, T. J. B.; MAKINO, Y.; GRILLO, R. L. M. Produção de celulase: efeitos do tratamento do bagaço de cana-de-açúcar na produção de celulase. **Coletânea do ITAL**, v. 21, n. 1, p. 29-44, 1991.
- MES-HARTREE, M.; HOGAN, C. M.; SADDLER, J. N. Recycle of enzymes and substrate following enzymatic hydrolysis of steam-pretreatment aspenwood. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 30, p. 558-564, 1987.
- MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 3, p. 426-428, 1959.
- RYU, D. D. Y.; LEE, S. B. **Enzyme engineering**. New York: Plenum Press, 1992. p. 325-333: Enzymatic hydrolysis of cellulose: effects of structural properties of cellulose on hydrolysis kinetics.
- SALES, A. M.; SALVA, T. J. G.; MENEZES, T. J. B. Incorporação de biomassa fúngica em resíduos agro-industriais por fermentação submersa. **Coletânea do ITAL**, v. 17, n. 2, p. 141-146, 1987.
- TSUNEDA, A.; THORN, R. G. Interactions of wood decay fungi with other microorganisms, with emphasis on the degradation of cell walls. **Canadian Journal of Botany**, v. 73, n. 1, p. 1325-1333, 1995.
- UPDEGRAFF, D. M. Semimicro determination of cellulose in biological materials. **Analytical Biochemistry**, v. 32, p. 420-424, 1969.
- Van WALSUM, G. P.; ALLEN, S. G.; SPENCER, M. J.; LASER, M. S.; ANTAL, M. J.; LYND, L. R. Conversion of lignocellulosics pretreatment with liquid hot water to ethanol. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 57-58, p. 157-158, 1996.
- ZONTA, E. P.; MACHADO, A. A. S. ANEST: Sistema de Análise Estatística para Computadores. Piracicaba: SEI, 1992. (software).