

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DA CANA-DE-AÇÚCAR: PRODUÇÃO DE CELULASES POR *Aspergillus niger* E AVALIAÇÃO DAS CINÉTICAS DA FERMENTAÇÃO E DA DESATIVAÇÃO ENZIMÁTICA

Daisy Catharina Rodrigues¹, Caroline Mariana de Aguiar²
Sérgio Luiz de Lucena³

4

RESUMO Celulases foram produzidas cultivando-se o fungo *Aspergillus niger* em meio de cultura com bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com NaOH 4%(m/v) como única fonte de carbono. A cinética da fermentação foi determinada analisando-se a atividade enzimática e medindo-se o pH do meio ao longo do tempo. A desativação enzimática foi avaliada nas condições de resfriamento (4°C) e de congelamento (-18°C) no armazenamento do caldo enzimático. Para a avaliação da cinética foi utilizado o bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado como substrato da hidrólise. Nas condições estudadas, foi concluído que o *Aspergillus niger* produz celulases quando cultivado em meio com bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado como fonte de carbono e que o tempo ideal para coleta do caldo enzimático foi de aproximadamente sete dias, com produtividade máxima de 0,0013 U/mL·h para a fermentação com 10g/L de bagaço e 0,0018 U/mL·h para as bateladas com 50 e 100g/L. O complexo celulásico presente no caldo enzimático não sofre desativação se armazenado a -18°C por 43 dias, porém, perde sua atividade em 43% após 48h se armazenado a 4°C.

PALAVRAS-CHAVE: resíduos lignocelulósicos, enzimas, fungos.

ENZYMATIC HYDROLYSIS OF SUGARCANE BAGASSE: CELLULASES PRODUCTION BY *Aspergillus niger* AND EVALUATION OF FERMENTATION AND ENZYMATIC DEACTIVATION KINETICS

SUMMARY Cellulases were obtained by fermentation using the fungus *Aspergillus niger* in a medium containing NaOH 4%(w/w) pretreated sugarcane bagasse as the only carbon source. The fermentation kinetic was observed by determining the enzymatic activity and the medium pH through the fermentation timecourse. The enzymatic deactivation was evaluated in the enzymatic broth by cooling (4°C) or freezing (-18°C) storage conditions. The pretreated sugarcane bagasse was used as the hydrolysis substrate for the determination of the kinetics. *Aspergillus niger* fungus produced cellulases when cultivated in a medium containing pretreated sugarcane bagasse and the ideal time for collecting the enzymatic broth was seven days, with maximum productivity of 0.0013 U/mL.h for the 10g of sugarcane bagasse/L batch and 0.0018 U/mL.h for the both 50 and 100g of sugarcane bagasse/L. The cellulosic complex presents in the broth does not suffer deactivation if stored at -18°C for 43 days, however it's activity drops by 43% if stored at 4°C during 48 hours.

KEYWORDS: lignocellulosic materials, enzymes, fungus.

INTRODUÇÃO

¹

Acadêmica do curso de Engenharia Química, Unioeste, Campus de Toledo, Toledo-PR, daisyktharina@hotmail.com.

² Mestre, Tecnólogo em Controle de Processos Químicos, UTFPR, Campus de Medianeira, Medianeira-PR.

³ Doutor, Engenheiro Químico, CECE, Campus de Toledo, Unioeste, Toledo-PR, lucenasergio@yahoo.com.br.

⁴Resultados não divulgados anteriormente

A celulose é a mais abundante biomassa renovável e sua produção mundial foi estimada em 1×10^{10} MT por ano (ALVIRA *et al.* 2009). Segundo TAMANINI (2004), a utilização de resíduos provenientes da exploração da biomassa lignocelulósica para obtenção de bioprodutos é uma alternativa para a produção de energia e de alimentos, já que os resíduos da agroindústria constituem reservas naturais renováveis disponíveis em grandes quantidades.

A cana-de-açúcar é uma planta de suma importância para a economia brasileira, tornando-se grande geradora de empregos e de energia via industrialização desta em açúcar e álcool (MANZANO *et al.* 2000). O bagaço de cana é produzido em grandes quantidades pelas indústrias de açúcar e álcool no Brasil (CARDONA *et al.* 2009) e, após a separação da garapa, o bagaço excedente é em parte queimado para a geração de calor e energia para a própria usina (ARMAS & BIANCHI 1990). Em geral, 1 ton de cana gera 280 kg de bagaço e $5,4 \times 10^8$ tons de cana-de-açúcar seca são processadas anualmente no mundo. Cerca de 50% desse resíduo é usado em usinas de destilaria como fonte de energia e o restante é estocado. Em virtude da importância do bagaço de cana como resíduo industrial, existe grande interesse no desenvolvimento de métodos para a produção biológica de combustíveis e produtos químicos que oferecem vantagens econômicas, ambientais e estratégicas (CARDONA *et al.* 2009). O uso do bagaço na busca por produtos de valor agregado apresenta uma série de vantagens: já vem processado das moendas; está disponível em grandes quantidades; tem custo mínimo; está pronto para uso no local, evitando aumento de custo devido ao transporte (OLIVÉRIO & HILST 2005).

O bagaço de cana é composto basicamente por celulose (41,7 a 45,3%), hemicelulose (31,6 a 34%) e lignina (12,6 a 16,5%) (MANZANO 2000; PIRES 2004). A celulose é um polímero formado por ligações $\beta(1 \rightarrow 4)$ entre moléculas de β -D-glicose. A maior parte da estrutura de celulose é organizada em regiões cristalinas altamente ordenadas, nas quais as cadeias de celulose são rigidamente empacotadas e de difícil hidrólise. Cerca de 15% dessa estrutura é formada por uma região chamada de amorfa, a qual pode ser facilmente hidrolisada (SHULER 1992). O grau de cristalinidade e o empacotamento provocado pela estrutura complexa da lignina limitam a hidrólise da celulose por qualquer agente hidrolítico (OJUMU 2003). O pré-tratamento da biomassa lignocelulósica é uma etapa necessária para alterar algumas características estruturais dos materiais lignocelulósicos, aumentando a acessibilidade da celulose ao ataque enzimático. Pré-tratamentos alcalinos aumentam a digestibilidade da celulose e são mais eficazes na solubilização de lignina, expondo a celulose e causando menor solubilização da hemicelulose do que pré-tratamentos com ácido ou processos hidrotérmicos. Hidróxido de sódio, potássio, cálcio e amônio são adequados aos pré-tratamentos alcalinos. NaOH provoca inchaço, aumentando a superfície interna da celulose e causa diminuição do grau de polimerização e cristalinidade, o que provoca a desestruturação da lignina (ALVIRA *et al.* 2009).

A hidrólise enzimática pode ser utilizada para a produção de açúcares de resíduos lignocelulósicos devido às condições suaves de trabalho relacionadas ao pH, temperatura e ausência de subprodutos (CARRILLO *et al.* 2005). Hidrólise enzimática da celulose é uma reação realizada pelas enzimas celulasas, as quais são altamente específicas. Celulasas são uma mistura de várias enzimas, dentre as quais pelo menos três grandes grupos estão envolvidos no processo de hidrólise da celulose: endoglucanases, que atacam as regiões de baixa cristalinidade na fibra de celulose, gerando cadeias livres; exoglucanases, que removem unidades de celobiose a partir das extremidades livres da cadeia; glucosidase, que hidrolisam a celobiose à glicose (MUSSATTO *et al.* 2008). Na natureza, existe uma grande variedade de micro-organismos que produzem celulasas, mas apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos (ROBSON & CHAMBLISS 1989). Muitas espécies de fungos possuem a habilidade de degradar a celulose produzindo as enzimas extracelulares celulasas. Os principais gêneros são *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Fusarium* (DASHTBAN *et al.* 2009). O fungo *Aspergillus niger* é fonte de celulasas destinadas ao uso alimentício e não alimentício e pode ser considerado, algumas vezes, superior aos outros fungos,

reconhecidamente bons produtores dos complexos celulolíticos e hemicelulolíticos, como *Trichoderma reesei*. (AGUIAR & MENEZES 2000).

As enzimas são desativadas, ou seja, perdem sua função catalítica, por vários fatores o que constitui uma limitação importante em muitos processos biotecnológicos. Desativação é definida como um processo em que a estrutura secundária, terciária ou quaternária de uma proteína é modificada (NAIDU & PANDA 2003). A desativação enzimática pode ocorrer devido à fatores como temperatura e ausência de substrato (BAILEY & OLLIS 1986). Estudos de desativação ajudam a compreender a relação entre estrutura e função de uma enzima em particular (NAIDU & PANDA 2003).

O presente trabalho teve como objetivo analisar a cinética da produção de celulases pelo fungo *Aspergillus niger* e também analisar a cinética da desativação das enzimas celulases presentes no caldo enzimático quando este é armazenado nas condições de resfriamento ou de congelamento.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS

Aspergillus niger foi cedido pelo laboratório de Bioquímica do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UNIOESTE – Cascavel, Brasil. A manutenção do fungo foi realizada em meio de cultura Ágar Sabouraud - Dextrose a 4°C com repicagens periódicas. O bagaço de cana-de-açúcar foi cedido pela Cooperativa Agrícola Regional de Produtores de Cana – COOPCANA - Paraíso do Norte, Brasil.

MÉTODOS

PREPARO DO INÓCULO

O desenvolvimento do *Aspergillus niger* foi realizado em meio de cultura ASD com incubação por sete dias a 30°C. Para obter o inóculo foram adicionados 10mL de água esterilizada no tubo contendo o fungo. Em seguida, realizou-se a raspagem dos esporos assepticamente com um bastão de vidro utilizando-se, assim, esta suspensão de esporos para o ensaio de fermentação (adaptado de AGUIAR & MENEZES, 2000). A determinação de esporos em suspensão na solução foi realizada com o auxílio de câmara de Neubauer.

CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO

Utilizou-se bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com NaOH como fonte de carbono (AGUIAR & MENEZES 2000) em meio de cultura adaptado de MANDELS & WEBER (1969). Adicionou-se 1mL de Tween 80 por litro de meio de cultura e 10, 50 e 100g/L de bagaço. As três bateladas foram esterilizadas a 120°C por 20 min. Em seguida, adicionou-se suspensão de esporos com concentração de, aproximadamente, 1×10^6 esporos/mL e fez-se a incubação a 30°C com agitação periódica. Periodicamente, amostras foram coletadas assepticamente e filtradas em papel filtro para a determinação da atividade enzimática. A produtividade foi calculada dividindo-se o valor da atividade enzimática obtida (U/mL) pelo número de horas de fermentação (h).

CINÉTICA DE DESATIVAÇÃO ENZIMÁTICA

Realizou-se ensaios de fermentação em duas bateladas com bagaço de cana-de-açúcar a 100g/L por sete dias. Após o término da fermentação, porções de 20mL dos caldos

enzimáticos foram armazenadas a 4°C e a -18°C. Porções dos caldos foram retiradas em diferentes intervalos de tempo para a determinação da atividade enzimática.

HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DO BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A hidrólise enzimática foi realizada adaptando-se o método proposto por GHOSE (1987), utilizando-se bagaço de cana pré-tratado como substrato de hidrólise e diminuindo-se o tempo de incubação para 50 min. As concentrações de açúcares redutores foram determinadas pelo método do DNS descrito por MILLER (1959). Segundo GHOSE (1987), uma unidade de atividade enzimática libera 1μmol de açúcar redutor por mL de caldo por minuto ($U = \mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$). Os resultados de atividade enzimática foram expressos em U/mL.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

CINÉTICA DA FERMENTAÇÃO

A Figura 01 mostra os resultados de atividade enzimática (AE) ao longo do tempo de fermentação para bateladas com 10g, 50g e 100g de bagaço de cana-de-açúcar por litro de caldo.

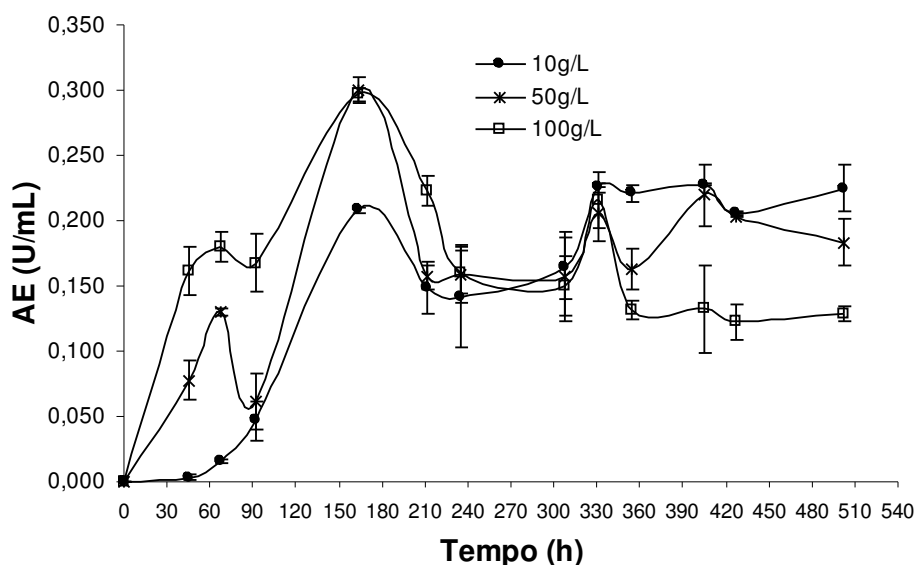


Figura 01. Atividade enzimática (AE) em função do tempo de fermentação para três diferentes quantidades de bagaço de cana-de-açúcar utilizadas como substrato fonte de carbono na produção de celulases pelo fungo *A. niger*.

Observa-se (Figura 01) que a produtividade máxima foi de 0,0013 U/mL·h para a batelada com 10g/L e 0,0018 U/mL·h para as bateladas com 50 e 100g/L, com atividades de 0,208 U/mL para a batelada com 10g/L, 0,300 U/mL para a batelada com 50g/L e 0,297 U/mL para a batelada com 100g/L, após 164h de fermentação. Portanto, o tempo ideal para a coleta do caldo da fermentação é de, aproximadamente, sete dias. AGUIAR & MENEZES (2000) em estudo de produção de celulases de *Aspergillus niger* com bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado com NaOH 4% como fonte de carbono, obtiveram valores de atividade enzimática de aproximadamente 0,27 U/mL para 10g/L de bagaço de cana. MENEZES *et al.* (1991) obtiveram valores próximos a 0,25 UI/mL de celulase total de *Aspergillus niger*, quando utilizaram bagaço de cana pré-tratado com solução de NaOH, como fonte de carbono.

Os resultados de atividade enzimática apresentaram-se mais altos para os sistemas em batelada com 50g/L e 100g/L provavelmente devido à maior quantidade de fonte de carbono no meio. Maiores quantidades de celulose presente no meio acarretam uma elevação dos níveis de endoglucanases (OLSSON *et al.* 2003), as quais são responsáveis pela liberação de glicose, celobiose e celodextrinas direto da cadeia de celulose. Observa-se também que, após 308 h de fermentação, ocorreu um aumento na atividade enzimática, provavelmente, devido ao fenômeno denominado crescimento críptico (ROSE & WILKINSON 1967; LI *et al.* 2008).

Em paralelo aos resultados de atividade enzimática, obteve-se medidas de pH das três bateladas. Os resultados de pH dos caldos em função do tempo de fermentação estão apresentados pela Figura 02.

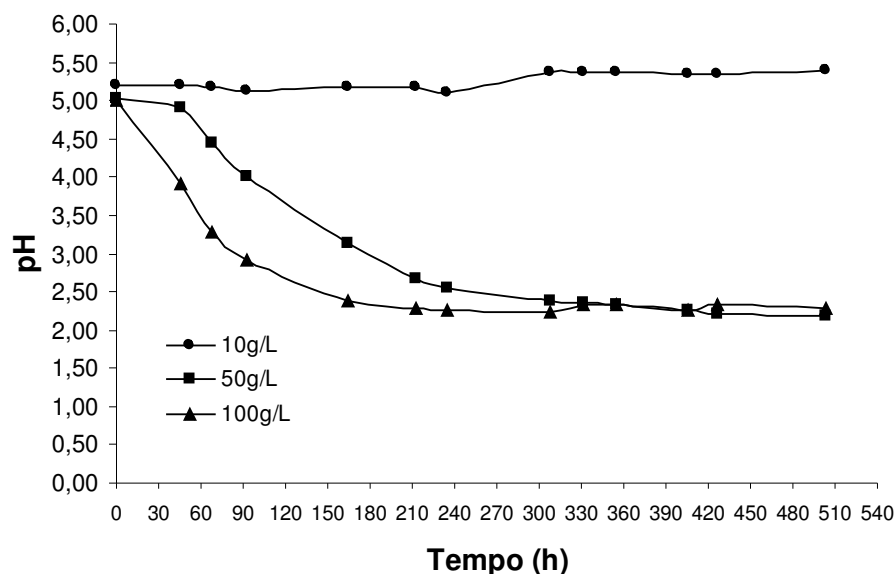


Figura 02. Variação do pH dos caldos em função do tempo de fermentação para três diferentes quantidades de bagaço de cana-de-açúcar utilizadas como substrato fonte de carbono na produção de celulasas pelo fungo *A. niger*.

Observa-se (Figura 02) uma diminuição do pH do caldo para os sistemas em batelada com 50 e 100g/L, inicialmente de 5,03 e 5,00, caindo para 2,67 e 2,29, respectivamente após 212h de fermentação. A redução do pH dos meios de fermentação pode ter ocorrido devido à produção de ácidos orgânicos pelo fungo. Para a batelada com 10g/L, o pH manteve-se constante ao longo da fermentação, o que pode ter ocorrido devido à baixa quantidade de fonte de carbono, acarretando em uma reduzida quantidade de açúcares liberados no meio. Segundo PRATA & SANTOS (2003), baixas concentrações de açúcares no meio fermentativo provocam baixos rendimentos na produção de ácidos.

CINÉTICA DE DESATIVAÇÃO ENZIMÁTICA

A Figura 03 apresenta os resultados de atividade enzimática (AE) ao longo do tempo quando o caldo enzimático de uma fermentação foi armazenado a -18°C .

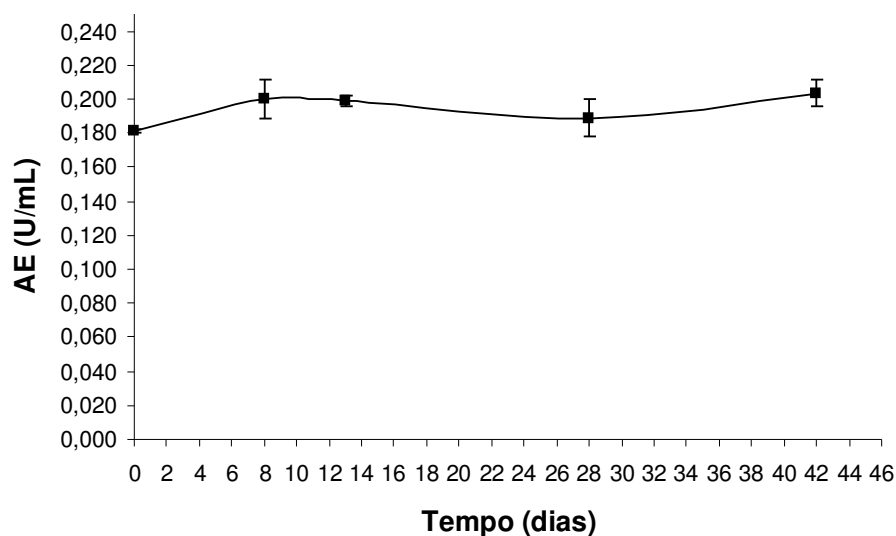


Figura 03. Variação da atividade enzimática (AE) ao longo do tempo para amostras do caldo enzimático armazenadas a -18°C .

Observa-se (Figura 03) que a atividade enzimática manteve-se aproximadamente constante, sendo 0,181 U/mL no tempo zero (logo após a extração) e 0,203 U/mL após 43 dias de armazenamento na temperatura de -18°C . Assim, pode-se afirmar que o complexo celulásico permanece estável quando congelado naquela temperatura por 43 dias. A Figura 04 apresenta os resultados de atividade enzimática (AE) ao longo do tempo quando o caldo enzimático foi armazenado a 4°C .

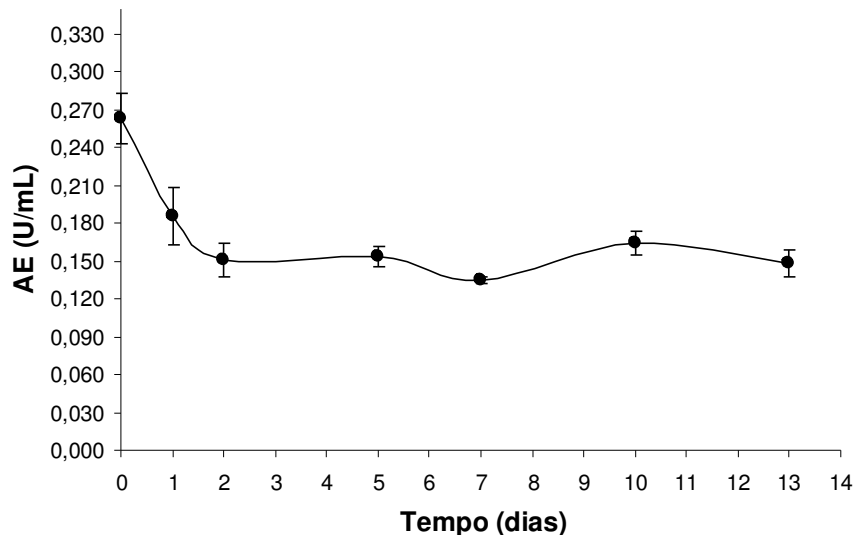


Figura 04. Variação da atividade enzimática (AE) ao longo do tempo para amostras do caldo enzimático armazenadas a 4°C .

A atividade enzimática do caldo dessa fermentação, conforme Figura 04, reduziu de 0,263 U/mL no tempo zero para 0,185 U/mL após 24h e para 0,151 U/mL após 48h de armazenamento, mantendo-se aproximadamente constante até o 13º dia (0,148 U/mL). Portanto, a redução da atividade enzimática foi de, aproximadamente, 30% após 24h e de, aproximadamente, 43% após 48h, sugerindo que o caldo enzimático deve ser utilizado logo após a extração ou congelado a -18°C para aplicação posterior.

CONCLUSÕES

O *Aspergillus niger* produz celulases quando cultivado em meio com bagaço de cana-de-açúcar pré-tratado. Analisando-se a cinética da fermentação, observa-se que o tempo de fermentação ideal para coleta do caldo enzimático, com produtividade máxima, foi de aproximadamente sete dias utilizando 100g/L de bagaço de cana como substrato fonte de carbono na fermentação. Também, o complexo celulásico não sofre desativação se armazenado a -18°C por 43 dias, porém, perde sua atividade em cerca de 43% após 48h se armazenado a 4°C.

AGRADECIMENTOS

Cooperativa Agrícola Regional de Produtores de Cana, por ter cedido o bagaço da cana-de-açúcar. Ao Grupo de Pesquisas em Recursos Pesqueiros e Limnologia e ao Grupo de Estudos de Manejo na Aqüicultura da Universidade Estadual do Oeste do Paraná pela contribuição à parte experimental do trabalho.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C. L.; MENEZES, T. J. B. Produção de celulases e xilanases por *Aspergillus niger* IZ-9 usando fermentação submersa sobre bagaço de cana-de-açúcar. **B. CEPPA**. v. 18, p. 57-70, 2000.
- ALVIRA, P.; TOMÁS-PEJÓ, E.; BALLESTEROS, M.; NEGRO, M. J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. **Bioresource Technology**. doi: 10.1016/j.biortech.2009.11.093, 2009.
- ARMAS, C. M.; BIANCHI, E. Aporte energético da indústria em usina sucro-alcooleira viabilidade econômica. **Stab, álcool e subprodutos**. v.8, p. 41-45, 1990.
- BAILEY, J. M.; OLLIS, D.F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. McGraw-Hill Intl Editions, p. 928, 1986.
- CARDONA, C. A.; QUINTERO, J. A.; PAZ, I. C. Production of bioethanol from sugar cane bagasse: Status and perspectives. **Bioresource Technology**. doi: 10.1016/j.biortech.2009.10.097, 2009.
- CARRILLO, F.; LIS, M. J.; COLOM, X.; LÓPEZ-MESAS, M.; VALLDEPERAS, J. Effect of alkali pretreatment on cellulase hydrolysis of wheat straw: Kinetic study. **Process Biochemistry**. doi: 10.1016/j.procbio.2005.03.003, 2005.
- DASHTBAN, M.; SCHRAFT, H.; QIN, W. Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives. **International Journal of Biological Sciences**. v.5, p. 578-595, 2009.
- GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and Applied Chemistry**. v.59, p. 257-268, 1987.
- MANDELS, M.; WEBER, J. The production of cellulases. In: **Advances in Chemistry Series**. v.95, p. 391-414, 1969.

MANZANO, R. P.; FUKUSHIMA, R. S.; GOMES, J. D. F.; GARIPPO, G. Digestibilidade do Bagaço de Cana-de-açúcar Tratado com Reagentes Químicos e Pressão de Vapor. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.29, p. 1196-1204, 2000.

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, p. 213-219, 1991.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**. v. 31, n.3, p. 426-428, 1959.

MUSSATTO, S. I.; FERNANDES, M.; MILAGRES, A. M. F.; ROBERTO, I. C. Effect of hemicellulose and lignin on enzymatic hydrolysis of cellulose from brewer's spent grain. **Enzyme and Microbial Technology**. doi: 10.1016/j.enzmictec.2007.11.006, 2008.

NAIDU, G. S. N.; PANDA, T. Studies on pH and thermal deactivation of pectolytic enzymes from *Aspergillus niger*. **Biochemical Engineering Journal**. doi: 10.1016/S1369-703X(03)00022-6, 2003.

OJUMU, T. V.; SOLOMON, B. O.; BETIKU, E.; LAYOKUN, S. K.; AMIGUN, B. Cellulase Production by *Aspergillus flavus* Linn Isolate NSPR 101 fermented in sawdust, bagasse and corncob. **African Journal of Biotechnology**. v. 2, n. 6, p. 150–152, 2003. Disponível em: <http://www.academicjournals.org/AJB/PDF/Pdf2003/JunePDFs2003/Ojumu%20et%20al.pdf>. Acesso em: 23 jul. 2009.

OLIVÉRIO, J. L.; HILST, A. G. P. Dhr-Dedini hidrólise rápida – Revolutionary process for producing alcohol from sugar cane bagasse. XXV International Society of Sugar Cane Technologists Congress, Guatemala, 2005.

OLSSON, L.; CHRISTENSEN, T. M. I. E.; HANSEN, K. P.; PALMQVIST, E. A. Influence of the carbon source on production of cellulases, hemicellulases and pectinases by *Trichoderma reesei* Rut C–30. **Enzyme and Microbial Technology**. doi:10.1016/S0141-0229(03)00181-9, 2003.

PIRES, A. J. V.; GARCIA, R.; FILHO, S. C. V.; PEREIRA, O. G.; CECON, P. R.; SILVA, F. F.; SILVA, P. A.; VELOSO, C. M. Novilhas Alimentadas com Bagaço de Cana-de-Açúcar Tratado com Amônia Anidra e, ou, Sulfeto de Sódio. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.33, p. 1078-1085, 2004.

PRATA, A. M. R.; SANTOS, R. S. Estudo da obtenção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* a partir de hidrolisado hemicelulósico de eucalipto. In: XIV Simpósio Nacional de Fermentações, Florianópolis. Programa e Trabalhos Completos. v.1, p. 1-7, 2003.

ROBSON, L. M.; CHAMBLISS, G. H. Cellulases of bacterial origin. **Enzyme and Microbial Technology**. doi: 11: 626-644, 1989.

ROSE, A. H.; WILKINSON, J. F. *Advances in Microbial Physiology*. Academic Press, London, 1967.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering – Basic Concepts**. Prentice Hall Int. Series in the Physical and Chemical Engineering Sciences, New Jersey, 1992.

TAMANINI, C.; HAULY, M. C. O. Resíduos agroindustriais para produção biotecnológica de xilitol. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 25, n. 4, p. 315-330, 2004. Disponível em: http://www.uel.br/proppg/portal/pages/arquivos/pesquisa/semina/pdf/semina_25_4_19_6.pdf. Acesso em: 12 ago. 2009.