

## Área: Engenharia de Alimentos

# DETERMINAÇÃO DA TEMPERATURA E pH ÓTIMOS PARA A ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE CELULASES PRODUZIDAS VIA FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

**Elenizi Prigol, Heloisa Tibolla, Luciane M. Colla, Tanara Sartori, Telma Elita Bertolin\***

*Laboratório de Fermentações, Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade de Passo Fundo.*

*\*E-mail: telma@upf.br*

## RESUMO

Os resíduos lignocelulósicos são renováveis, ambientalmente corretos e capazes de contribuir para a geração de energia. A bioconversão desses resíduos em glicose é realizada pelas enzimas do complexo celulolítico, constituído pelas celulases totais, endo-glucanases e  $\beta$ -glicosidases. Estas enzimas apresentam temperatura e pH para os quais sua atividade é máxima, sendo importante a determinação destes, a fim de definir a aplicação da enzima. Objetivou-se a determinação da temperatura e pH ótimos das celulases produzidas via fermentação em estado sólido, utilizando sabugo de milho como substrato e indutores carboximetilcelulose e papel de filtro. Avaliou-se a atividade enzimática do complexo celulolítico para determinar o pH e temperatura ótimos de atuação, através da técnica sequencial de planejamento experimental. Os resultados foram expressos em U/g, sendo que U é definido como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 mg de açúcar redutor por hora. As máximas atividades enzimáticas utilizando indutor carboximetilcelulose foram obtidas em temperatura de 40 °C e pH 6,0 para as endo-glucanases (178,03 U/g) e celulases totais (116,45 U/g) e na mesma temperatura e pH 4,0 para as  $\beta$ -glicosidases (86,63 U/g). Utilizando o indutor papel de filtro, as máximas atividades enzimáticas para as endo-glucanases foram à temperatura de 50 °C e pH 5,0, com valor de 214,95 U/g e para as celulases totais e  $\beta$ -glicosidases à temperatura de 60 °C e pH 4,0, com valores de 124,42 U/g e 87,31 U/g, respectivamente. A atuação das enzimas do complexo celulolítico foi favorecida utilizando o indutor papel de filtro nas temperaturas e pH especificados.

**Palavras-chave:** Bioconversão, complexo celulolítico, atuação enzimática.

## 1 INTRODUÇÃO

A busca de novas matrizes energéticas renováveis em substituição aos combustíveis fósseis tem sido importante, visto que, além de serem abundantes, como a celulose, apresenta baixo impacto ambiental (REYES et al., 1998).

A biomassa lignocelulósica é a maior fonte de carboidrato existente em abundância, pois é originada de atividades agrícolas, sendo o principal componente da parede celular dos vegetais, desta forma, atrai o interesse de pesquisadores na sua utilização para o desenvolvimento de uma nova fonte de energia renovável. A celulose na natureza é encontrada na forma de complexos e devido sua heterogeneidade e insolubilidade, torna-se um substrato de difícil hidrólise (HECK et al., 2002).

As enzimas celulolíticas são produzidas por microrganismos, como bactérias e fungos, estas atuam em sinergismo rompendo as ligações glicosídicas do tipo  $\beta$ -1,4 da cadeia de celulose, resultando na liberação de oligossacarídeos, celobiose e glicose (CASTRO, 2007).

A maior dificuldade para o aproveitamento dos resíduos lignocelulósicos está representada pela barreira física formada pela lignina, o que impede o aproveitamento da celulose nativa, pois as enzimas não conseguem penetrar com facilidade esta barreira. A separação da lignina é normalmente feita por hidrólise ácida ou básica (RUEGGER; TAUKNISIELO, 2004).

As celulases, assim como as demais enzimas extracelulares de hidrólise, são induzidas quando há necessidade de serem secretadas pelos microrganismos para que estes cresçam em celulose. Os indutores enzimáticos são substâncias que apresentam capacidade de aumentar atividade das enzimas, aumentando a metabolização de determinados agentes (REGULY, 1996). As reações enzimáticas são afetadas por fatores como pH e temperatura, podendo estes aumentar ou diminuir a velocidade das reações catalisadas (BORZANI et al., 2001).

Neste contexto, objetivou-se a determinação da temperatura e pH ótimos das celulases produzidas via fermentação em estado sólido (FES), utilizando sabugo de milho como substrato e indutores carboximetilcelulose e papel de filtro.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 MATERIAL E MÉTODOS

#### 2.1.1 Microrganismo e manutenção

O microrganismo utilizado foi o *Trichoderma viride*, obtido da Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia André Tosello – Campinas – SP, estes foram mantidos em meio ágar

papel de filtro. Os repiques foram realizados em intervalos de 30 dias e mantidos sob refrigeração a 4 °C.

### 2.1.2 Preparo do inóculo

O inóculo foi preparado em erlenmeyers de 1000 mL com 50 mL de meio ágar papel de filtro, aos quais foi adicionado 1 mL de suspensão de esporos. Os erlenmeyers foram mantidos em estufa a 30 °C por 7 d, para posterior suspensão dos esporos com adição de água destilada e esterilizada, a qual foi filtrada em funil contendo algodão.

### 2.1.3 Deslignificação do substrato

A deslignificação da fonte de carbono foi realizada a partir de uma concentração de substrato (matéria-prima lignificada) de 10 % (p/v), cuja solução reagente foi NaOH 0,25 mol/L. Essa mistura foi submetida a autoclavagem a 121 °C por 1 h à 1,1 atm. Após adicionou-se H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M a uma concentração de 0,125 mLácido/mLbase para neutralizar o material deslignificado. O excesso de reagentes foi removido e o substrato deslignificado foi submetido à estufa 35 °C para remoção total da umidade, produzindo substrato 50 % deslignificado.

### 2.1.4 Preparo do meio de cultivo

A fonte de carbono utilizada foi sabugo de milho deslignificado e triturado com mesh entre 50 e 14. A este substrato foi adicionado solução de macro e micronutrientes, segundo Mandels; Reese (1957), a uma proporção de 1:1. A umidade do substrato foi ajustada em 63 % com adição de água e o pH do meio em 4,8 com solução ácida (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 mol/L) proporcionando condições ótimas para a condução da fermentação.

### 2.1.5 Fermentação em estado sólido

A fermentação foi conduzida em erlenmeyers de 250 mL, os quais continham 10 g do meio de cultivo, 0,5 g do indutor (Carboximetilcelulose (CMC) ou Papel de filtro) e 1,0 mL de suspensão de esporos (inóculo) que continha 10<sup>7</sup> esporos/mL. Os experimentos foram incubados em estufa 30 °C, sendo amostras coletadas nos tempos inicial e a cada 24 h até o tempo de 192 h, totalizando 8 d de fermentação.

### 2.1.6 Determinação da atividade das celulasas

A extração da enzima celulase foi conduzida a partir da amostra adicionada de tampão citrato 0,05 M, pH 4,8, submetida à agitação 150 rpm por 30 min. A suspensão obtida foi utilizada para posteriores análises de endo  $\beta$ -1,4 glucanase, celulasas totais e  $\beta$ -glicosidase, adaptadas do método descrito por Ghose (1987). Os resultados foram expressos em unidades por grama (U/g), sendo que uma unidade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima capaz de liberar 1 mg de açúcar redutor por hora, sob as condições de experimento.

### 2.1.7 Caracterização da enzima

As enzimas produzidas via fermentação em estado sólido, foram caracterizadas quanto ao pH e temperatura para obtenção da máxima atividade enzimática. O pH e temperatura foram otimizados através da utilização da metodologia de superfície de resposta. Foi realizado um Planejamento Fatorial Completo  $2^2$  (PFC  $2^2$ ) com três pontos centrais, conforme a matriz de experimentos apresentada na Tabela 1.

Tabela 1: Matriz de experimentos do Planejamento Fatorial Completo  $2^2$  com três pontos centrais para a otimização da temperatura e pH ótimos para as diferentes enzimas do complexo celulolítico

Experimento	(X <sub>1</sub> )*	(X <sub>2</sub> )**
1	-1 (4,0)	-1 (40 °C)
2	-1 (4,0)	+1 (60 °C)
3	+1 (6,0)	-1 (40 °C)
4	+1 (6,0)	+1 (60 °C)
5	0 (5,0)	0 (50 °C)
6	0 (5,0)	0 (50 °C)
7	0 (5,0)	0 (50 °C)

X<sub>1</sub>\*: pH; X<sub>2</sub>\*\* : Temperatura

### 2.1.8 Análise estatística

Os resultados de atividade enzimática obtidos nos planejamentos foram analisados através de Análise de Variância.

## 2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As Tabelas 2 e 3 apresentam os resultados de atividade enzimática das endo-glucanases, celulasas totais e  $\beta$ -glicosidases, obtidas para as condições de pH e temperatura testadas no Planejamento Fatorial Completo  $2^2$ , utilizando diferentes indutores.

A comparação entre os experimentos 1, 2, 3 e 4, apresentados na Tabela 2, para a atividade enzimática das endo-glucanases, mostra que os melhores resultados foram obtidos na temperatura de 40 °C em ambos pH. Comparando-se os resultados de atividade enzimática dos pontos centrais, referentes aos experimentos 5, 6 e 7, observa-se que somente foram superiores ao experimento 2. A melhor atividade enzimática das endo-glucanases utilizando carboximetilcelulose (CMC) como indutor foi obtida no experimento 3 (40 °C e pH 6,0), com valor de  $178,03 \pm 0,8$  U/g.

Os resultados de atividade enzimática das celulasas totais (Tabela 2) mostram que com aumento do pH a enzima obteve sua máxima atividade, nas temperaturas de 40 °C e 60 °C, como pode ser observado nos experimentos 1, 2, 3 e 4. Os pontos centrais apresentaram as atividades enzimáticas mínimas. Quando a CMC foi utilizada como indutor obteve-se o melhor resultado de atividade enzimática de  $116,45 \pm 0,04$  U/g, no experimento 3 (40 °C e pH 6,0).

A variação da atividade enzimática da  $\beta$ -glicosidase frente a diferentes pH e temperaturas, estão apresentadas na Tabela 2. Observa-se que com a diminuição do pH, em ambas as temperaturas (40 °C e 60 °C), obtiveram-se as máximas atividades da enzima, apresentadas nos experimentos 1 e 2, sendo que as mínimas foram observadas nos pontos centrais, experimentos 5, 6 e 7. O melhor resultado foi obtido quando utilizou-se CMC como indutor, no experimento 1 (40 °C e pH 4,0), com valor de  $86,63 \pm 0,6$  U/g.

Ao comparar os experimentos 1, 2, 3 e 4, para as endo-glucanases (Tabela 3), pode-se observar que os maiores valores de atividade enzimática foram obtidos nos experimentos 2 e 3, com atividades enzimáticas de  $213,94 \pm 0,7$  U/g e  $213,94 \pm 0,7$  U/g, respectivamente. A

máxima atividade obtida para a enzima, utilizando-se papel de filtro como indutor, foi observada no experimento 5 ( $214,95 \pm 0,7$  U/g).

Tabela 2: Atividade enzimática (U/g) obtidas nas condições de pH e temperatura testadas no Planejamento Fatorial Completo  $2^2$ , utilizando carboximetilcelulase como indutor

Experimento	$X_1^*$	$X_2^{**} (^{\circ}\text{C})$	Atividade enzimática (U/g)***		
			Endo-glucanases	Celulases totais	$\beta$ -glicosidases
1	4,0	40	147,18 $\pm$ 0,8	68,56 $\pm$ 0,04	86,63 $\pm$ 0,6
2	4,0	60	134,53 $\pm$ 0,8	73,59 $\pm$ 0,04	85,04 $\pm$ 0,6
3	6,0	40	178,03 $\pm$ 0,8	116,45 $\pm$ 0,04	54,74 $\pm$ 0,6
4	6,0	60	168,93 $\pm$ 0,8	85,73 $\pm$ 0,04	59,48 $\pm$ 0,6
5	5,0	50	141,61 $\pm$ 0,8	67,14 $\pm$ 0,04	54,28 $\pm$ 0,6
6	5,0	50	137,57 $\pm$ 0,8	66,38 $\pm$ 0,04	55,19 $\pm$ 0,6
7	5,0	50	147,68 $\pm$ 0,8	66,00 $\pm$ 0,04	56,09 $\pm$ 0,6

\* $X_1$ : pH; \*\* $X_2$ : Temperatura; \*\*\*Resultados de média $\pm$ desvio padrão

Tabela 3: Atividade enzimática (U/g) obtidas nas condições de pH e temperatura testadas no Planejamento Fatorial Completo  $2^2$ , utilizando papel de filtro como indutor

Experimento	$X_1^*$	$X_2^{**} (^{\circ}\text{C})$	Atividade enzimática (U/g)***		
			Endo-glucanases	Celulases totais	$\beta$ -glicosidases
1	4,0	40	211,92 $\pm$ 0,7	113,05 $\pm$ 0,05	71,70 $\pm$ 0,3
2	4,0	60	213,94 $\pm$ 0,7	124,42 $\pm$ 0,05	87,31 $\pm$ 0,3
3	6,0	40	213,94 $\pm$ 0,7	84,97 $\pm$ 0,05	65,34 $\pm$ 0,3
4	6,0	60	210,40 $\pm$ 0,7	108,87 $\pm$ 0,05	67,63 $\pm$ 0,3
5	5,0	50	214,95 $\pm$ 0,7	103,18 $\pm$ 0,05	56,99 $\pm$ 0,3
6	5,0	50	211,41 $\pm$ 0,7	103,94 $\pm$ 0,05	57,68 $\pm$ 0,3
7	5,0	50	206,86 $\pm$ 0,7	102,42 $\pm$ 0,05	59,26 $\pm$ 0,3

\* $X_1$ : pH; \*\* $X_2$ : Temperatura; \*\*\*Resultados de média $\pm$ desvio padrão

As variações das atividade enzimática das celulases totais (Tabela 3) mostram que com a diminuição do pH e aumento da temperatura a enzima obteve os maiores valores de atividade enzimática, como pode ser observado nos experimentos 1, 2, 3 e 4. Quando o papel de filtro foi utilizado como indutor, a máxima atividade obtida foi no experimento 2 (60 °C e pH 4,0), com valor de  $124,42 \pm 0,05$  U/g.

Os resultados das atividades enzimáticas das  $\beta$ -glicosidasases frente a diferentes pH e temperaturas, estão apresentados na Tabela 3. Observa-se que com o aumento de temperatura e diminuição do pH, obtiveram-se as máximas atividades da enzima, apresentadas nos experimentos 1, 2, 3 e 4, sendo que as mínimas foram observadas nos pontos centrais, experimentos 5, 6 e 7. O melhor resultado obtido, quando da utilização de papel de filtro como indutor, foi no experimento 2 (60 °C e pH 4,0), com valor de  $87,31 \pm 0,3$ U/g.

A Tabela 4 apresenta a análise de variância da influência das variáveis pH e temperatura sobre a atividade da endo-glucanase utilizando CMC como indutor. Verifica-se o pH apresentou influência significativa sobre a atividade enzimática de endo-glucanase ( $p=0,0008$ ). Não apresentaram efeito significativo a temperatura ( $p= 0,1569$ ) e a interação das variáveis pH e temperatura ( $p=0,8092$ ).

A Tabela 5 apresenta os efeitos estimados das variáveis pH e temperatura sobre a atividade da endo-glucanase utilizando CMC como indutor. Verifica-se que a temperatura apresentou efeito linear negativo e o pH, positivo, ou seja, diminuindo a temperatura e aumentando o pH a atividade da enzima endo-glucanase aumenta. O maior efeito observado sobre a atividade enzimática foi o do pH (32,62 U/g), ou seja, a atividade enzimática aumenta de 32,62 U/g variando-se o pH de 4,0 para 6,0.

A Tabela 6 apresenta a análise de variância da influência das variáveis pH e temperatura sobre a atividade das celulases totais utilizando CMC como indutor. A análise de variância do Planejamento Fatorial Completo  $2^2$  indicou significância ( $p<0,05$ ) para a variável pH ( $p=0,0029$ ) e para a interação das variáveis pH e temperatura ( $p=0,0449$ ). A temperatura não apresentou efeito significativo ( $p= 0,1301$ ).

A Tabela 7 apresenta os efeitos estimados das variáveis pH e temperatura sobre a atividade das celulases totais utilizando CMC como indutor. A variável pH apresenta efeito linear positivo e a variável temperatura negativo, ou seja, aumentando o pH e diminuindo a temperatura a atividade da enzima celulases totais aumenta. O maior efeito observado sobre a

atividade enzimática foi o do pH (29,97 U/g), ou seja, a atividade enzimática aumenta de 29,97 U/g variando-se o de 4,0 para 6,0.

Tabela 4: Análise de variância do efeito do pH e temperatura sobre a atividade da endo-glucanase utilizando CMC como indutor

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor F	Nível de Significância (p)
X <sub>1</sub> *	2128,40	1	2128,40	20,77	0,0008
X <sub>2</sub> **	236,49	1	236,49	2,31	0,1569
X <sub>1</sub> .X <sub>2</sub>	6,27	1	6,28	0,06	0,8092

\*X<sub>1</sub>: pH; \*\*X<sub>2</sub>: Temperatura

Tabela 5: Efeitos estimados das variáveis pH e temperatura sobre a atividade da endo-glucanase utilizando CMC como indutor

Fonte de variação	Efeitos estimados	P
Média	150,99	0,0000
X <sub>1</sub> *	32,62	0,0008
X <sub>2</sub> **	-10,87	0,1569
X <sub>1</sub> .X <sub>2</sub>	1,77	0,8092

\*X<sub>1</sub>: pH; \*\*X<sub>2</sub>: Temperatura

Tabela 6: Análise de variância do efeito do pH e temperatura sobre a atividade das celulases totais utilizando CMC como indutor

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor F	Nível de Significância (p)
X <sub>1</sub> *	1796,02	1	1796,02	14,45	0,0029
X <sub>2</sub> **	332,67	1	332,67	2,68	0,1301
X <sub>1</sub> .X <sub>2</sub>	635,70	1	635,70	5,11	0,0449

\*X<sub>1</sub>: pH; \*\*X<sub>2</sub>: Temperatura



A Tabela 8 apresenta a análise de variância da influência das variáveis pH e temperatura sobre a atividade das  $\beta$ - glicosidases utilizando CMC como indutor. Verificou-se que a variável pH influenciou significativamente ( $p < 0,05$ ) a atividade enzimática, sendo o nível de significância ( $p = 0,0013$ ). A temperatura ( $p = 0,8193$ ) e a interação das variáveis pH e temperatura ( $p = 0,6491$ ) não foram significativas.

Tabela 7: Efeitos estimados das variáveis pH e temperatura sobre a atividade das celulasas totais utilizando CMC como indutor

Fonte de variação	Efeitos estimados	p
Média	77,53	0,0000
X <sub>1</sub> *	29,97	0,0029
X <sub>2</sub> **	-12,89	0,1301
X <sub>1</sub> .X <sub>2</sub>	-17,83	0,0449

\*X<sub>1</sub>: pH; \*\*X<sub>2</sub>: Temperatura

Tabela 8: Análise de variância do efeito do pH e temperatura sobre a atividade das  $\beta$ - glicosidases utilizando CMC como indutor

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor F	Nível de Significância (p)
X <sub>1</sub> *	1650,24	1	1650,24	18,00	0,0013
X <sub>2</sub> **	5,01	1	5,01	0,05	0,8193
X <sub>1</sub> .X <sub>2</sub>	20,05	1	20,05	0,22	0,6491

\*X<sub>1</sub>: pH; \*\*X<sub>2</sub>: Temperatura

A Tabela 9 apresenta os efeitos estimados das variáveis pH e temperatura sobre a atividade das  $\beta$ - glicosidases utilizando CMC como indutor. Verifica-se que a temperatura apresentou efeito linear positivo e o pH negativo, ou seja, diminuindo o pH e aumentando a temperatura a atividade da enzima  $\beta$ - glicosidase aumenta. O maior efeito observado sobre a atividade enzimática foi o do pH (28,72 U/g), ou seja, a atividade enzimática diminui de 28,72 U/g variando-se o pH de 4,0 para 6,0.

A Tabela 10 apresenta a análise de variância da influência das variáveis pH e temperatura sobre a atividade das endo-glucanases utilizando papel de filtro como indutor. A análise de variância do Planejamento Fatorial Completo  $2^2$  indicou não haver variáveis significativas ( $p > 0,05$ ) para as variáveis pH ( $p = 0,8771$ ), temperatura ( $p = 0,9383$ ) e para a interação das variáveis pH e temperatura ( $p = 0,7000$ ).

Tabela 9: Efeitos estimados das variáveis pH e temperatura sobre a atividade das  $\beta$ -glicosidases utilizando CMC como indutor

Fonte de variação	Efeitos estimados	p
Média	64,36	0,0000
X <sub>1</sub> *	-28,72	0,0013
X <sub>2</sub> **	1,58	0,8193
X <sub>1</sub> .X <sub>2</sub>	3,17	0,6491

\*X<sub>1</sub>: pH; \*\*X<sub>2</sub>: Temperatura

Tabela 10: Análise de variância do efeito do pH e temperatura sobre a atividade das endo-glucanases utilizando papel de filtro como indutor

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor F	Nível de Significância (p)
X <sub>1</sub> *	2,0464	1	2,0464	0,0250	0,8771
X <sub>2</sub> **	0,5116	1	0,5116	0,0062	0,9383
X <sub>1</sub> .X <sub>2</sub>	12,7901	1	12,7901	0,1564	0,7000

\*X<sub>1</sub>: pH; \*\*X<sub>2</sub>: Temperatura

A Tabela 11 apresenta a análise de variância da influência das variáveis pH e temperatura sobre a atividade das celulasas totais utilizando papel de filtro como indutor. Verificou-se que as variáveis estudadas influenciaram significativamente ( $p < 0,05$ ) a atividade enzimática, sendo os níveis de significância observados para o pH, temperatura e para a interação de  $p < 0,001$ ,  $p < 0,001$  e  $p = 0,0532$ , respectivamente.

A Tabela 12 apresenta os efeitos estimados das variáveis pH e temperatura sobre a atividade das celulasas totais utilizando papel de filtro como indutor. A temperatura

apresentou efeito linear positivo e a variável pH negativo, ou seja, diminuindo o pH e aumentando a temperatura a atividade da enzima celulases totais aumenta. O maior efeito observado sobre a atividade enzimática foi a do pH (21,81 U/g), ou seja, a atividade enzimática diminui de 21,81 U/g variando-se o pH de 4,0 para 6,0.

Tabela 11: Análise de variância do efeito do pH e temperatura sobre a atividade das celulases totais utilizando papel de filtro como indutor

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor F	Nível de Significância (p)
X <sub>1</sub> *	951,46	1	951,46	56,94	<0,001
X <sub>2</sub> **	622,25	1	622,25	37,24	<0,001
X <sub>1</sub> .X <sub>2</sub>	78,35	1	78,35	4,69	0,0532

\*X<sub>1</sub>: pH; \*\*X<sub>2</sub>: Temperatura

Tabela 12: Efeitos estimados das variáveis pH e temperatura sobre a atividade das celulases totais utilizando papel de filtro como indutor

Fonte de variação	Efeitos estimados	p
Média	105,35	<0,001
X <sub>1</sub> *	-21,81	<0,001
X <sub>2</sub> **	17,64	<0,001
X <sub>1</sub> .X <sub>2</sub>	6,26	0,0532

\*X<sub>1</sub>: pH; \*\*X<sub>2</sub>: Temperatura

A Tabela 13 apresenta a análise de variância da influência das variáveis pH e temperatura sobre a atividade das  $\beta$ -glicosidases utilizando papel de filtro como indutor. Verificou-se que o pH foi a única a variável que apresentou efeito significativo sobre a resposta (p=0,0585). Não apresentaram efeito significativo a temperatura (p= 0,1750) e a interação das variáveis pH e temperatura (p=0,3020).

A Tabela 14 apresenta os efeitos estimados das variáveis pH e temperatura sobre a atividade das  $\beta$ -glicosidases utilizando papel de filtro como indutor. Verifica-se que a variável pH apresenta efeito linear negativo e a variável temperatura positivo, ou seja, diminuindo o

pH e aumentando a temperatura a atividade da enzima  $\beta$ -glicosidase aumenta. O maior efeito observado sobre a atividade enzimática foi o do pH (13,0 U/g), ou seja, a atividade enzimática diminui de 13,0 U/g variando-se o pH de 4,0 para 6,0. Embora o efeito da temperatura tenha sido positivo, este não foi significativo.

Tabela 13: Análise de variância do efeito do pH e temperatura sobre a atividade das  $\beta$ -glicosidases utilizando papel de filtro como indutor

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	Valor F	Nível de Significância (p)
X <sub>1</sub> *	338,279	1	338,2794	4,4537	0,0585
X <sub>2</sub> **	159,637	1	159,6372	2,1017	0,1750
X <sub>1</sub> .X <sub>2</sub>	89,040	1	89,0397	1,1722	0,3020

\*X<sub>1</sub>: pH; \*\*X<sub>2</sub>: Temperatura

Tabela 14: Efeitos estimados das variáveis pH e temperatura sobre a atividade das  $\beta$ -glicosidases utilizando papel de filtro como indutor

Fonte de variação	Efeitos estimados	P
Média	66,35	0,0000
X <sub>1</sub> *	-13,00	0,0585
X <sub>2</sub> **	8,93	0,1750
X <sub>1</sub> .X <sub>2</sub>	-6,67	0,3020

\*X<sub>1</sub>: pH; \*\*X<sub>2</sub>: Temperatura

### 3 CONCLUSÃO

A determinação do pH e temperatura das enzimas do complexo celulolítico, mostrou que utilizando sabugo de milho como substrato e carboximetilcelulose como indutor, as máximas atividades enzimáticas foram obtidas em temperatura de 40 °C para as três enzimas do complexo celulolítico e em pH 6,0 para as endo-glucanases e celulases totais e pH 4,0 para as  $\beta$ -glicosidases.

As máximas atividades enzimáticas para as celulases totais e  $\beta$ -glicosidasas, utilizando o substrato sabugo de milho e o indutor papel de filtro, foram obtidas em temperatura de 60 °C e pH 4,0 e para as endo-glucanases em temperatura de 50 °C e pH 5,0.

A atuação das enzimas do complexo celulolítico é favorecida utilizando o indutor papel de filtro nas temperaturas e pH especificados.

A utilização de resíduos agrícolas é viável para a síntese de celulases por microrganismos e representa a busca de fontes renováveis para a substituição da matriz energética fóssil.

## REFERÊNCIAS

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. *Biotecnologia Industrial*. 1. ed. v. 1/2. São Paulo: Editora Edgard Blücher LTDA, 2001.

CASTRO, A. M.; PEDRO, K. C. N. R.; FERREIRA, M. C.; CRUZ, J. C.; LEITE, S. G. F.; PEREIRA, N. J. *Produção e caracterização das celulases de Aspergillus níger obtidas a partir de celulignina de bagaço de cana-de-açúcar*. Sinaferm, 2007.

GHOSE, T. K. *Measurement of cellulase activities*. *International Union of Pure and Applied Chemistry*, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

HECK, J. X.; MATOS, G.S.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. Z. *Cellulase and xyltnase protuction by isolated Amazon Bacillus strains using soybean industrial residue based solid-state cultivation*. *Brazilian Journal of microbiology*, v. 33, p. 213-218, 2002.

MANDELS, M.; REESE, E. T. *Induction of cellulase in Trichoderma Viride as influenced by carbon sources and metals*. *Journal of Bacteriology*, v. 73, n. 2, p. 269-278, 1957.

REGULY, J. C. *Biotecnologia dos Processos Fermentativos*. 1. ed. v. 1. Pelotas: Editora Universitária UFPel, 1996.

REYES, J.; ZAMOURA, P. P.; DURÁN, N. *Hidrólise enzimática da casca de arroz utilizando-se celulases. Efeito de tratamentos químicos e fotoquímicos*. *Química Nova*, v. 21, n. 2, p. 140-143, 1998.

RUEGGER, M. J. S.; TAU-K-TORNISIELO, S. M. *Atividade da celulase de fungos isolados do solo da estação ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil*. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 27, n. 2, p. 205-211, 2004.