

## ESTUDO COMPARATIVO DA ATIVIDADE DE CELULASES FÚNGICAS INDUZIDAS POR SUBSTRATOS DE SERRAGEM DE EUCALIPTO E PALHA DE ARROZ

Silva DB da <sup>\*</sup>; Chagas Júnior AF<sup>\*\*</sup>; Scheidt GN<sup>\*\*\*</sup>; Barilli J<sup>\*\*\*\*</sup>; Giongo M<sup>\*\*\*\*\*</sup>

### Resumo

Por sua alta produtividade agrícola, o Brasil é destaque no cenário internacional. Nos últimos anos a área plantada teve grande crescimento, o que determina diretamente a quantidade de resíduos agroindustriais gerados. Paralelamente à alta produtividade, a matriz energética brasileira não possui indicativos quanto à viabilidade de atividades relacionadas ao reaproveitamento desses resíduos. A conversão de biomassa de celulose por microrganismos é uma alternativa sustentável e potencial, não somente na produção de açúcar, mas também na produção de produtos com alto valor agregado. Fungos filamentosos, com morfologia característica do gênero *Trichoderma* spp., isolados no cerrado tocantinense, foram inoculados em resíduos de sabugo de milho, palha de arroz e serragem de eucalipto para a quantificação de açúcares redutores. Das 70 linhagens disponíveis, os isolados UFTMG24 e UFTJCO19 apresentaram as respectivas atividades de FPase 1,05 UI.mL<sup>-1</sup>e1,05 UI.mL<sup>-1</sup>

<sup>\*</sup> Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal do Tocantins; Rua Badejos, chácara 69 a 72, lote 7, Jardim Servilha, 77420970, Gurupi, Tocantins, Brasil; damisb@gmail.com;

<sup>\*\*</sup> Professor adjunto II do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia na Universidade Federal do Tocantins; chagasjr@uft.edu.br

<sup>\*\*\*</sup> Professor adjunto III do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia na Universidade Federal do Tocantins; scheidt@uft.edu.br

<sup>\*\*\*\*</sup> Professora adjunto IV do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia na Universidade Federal do Tocantins; jubarilli@uft.edu.br

<sup>\*\*\*\*\*</sup> Professor adjunto II do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia na Universidade Federal do Tocantins; giongo@uft.edu.br

(palha de arroz); 1,34 UI.mL<sup>-1</sup> e 1,55 UI.mL<sup>-1</sup> (serragem de eucalipto). Quanto à atividade de CMCase, o isolado UFTJCO24 se sobressaiu com a atividade enzimática 1,67 UI.mL<sup>-1</sup> na palha de arroz; e o isolado UFTMG15 na serragem de eucalipto com 0,10 UI.mL<sup>-1</sup>.

Palavras-chave: Biocombustíveis. Enzimas celulolíticas. Resíduos agroindustriais. Seleção de fungos.

### ***Comparative study of activity by fungal cellulases induced by the sawdust and rice straw substrates***

#### *Abstract*

*Due to its high agricultural productivity, Brazil is featured in the international scenario. In recent years, the planted area had great growth, which directly determines the amount of agro-industrial wastes generated. In addition to high productivity, the Brazilian energy matrix has no indicative as to the viability of activities related to the reuse of waste. The conversion of biomass to cellulose by microorganisms is a sustainable alternative and potential, not only in the production of sugar, but also in the production of high value-added products. Filamentous fungi, with characteristic morphology of the genus *Trichoderma* spp., isolated in Tocantins state cerrado, were inoculated in waste of corn cob, rice straw and eucalyptus sawdust for quantification of reducing sugars. Of the 70 strains available, the isolated UFTMG24 and UFTJCO19 presented the respective activities of FPase 1.05 Ul.mL<sup>-1</sup> and 1.05 IU.mL<sup>-1</sup> (rice straw); 1.34 Ul.mL<sup>-1</sup> and 1.55 Ul.mL<sup>-1</sup> (eucalyptus sawdust). Regarding the activity of CMCase isolate UFTJCO24 stood out with the enzyme activity 1.67 Ul.mL<sup>-1</sup> in rice straw; and the isolated UFTMG15 in eucalyptus sawdust with 0.10 Ul.mL<sup>-1</sup>.*

*Keywords: Biofuels. Cellulolytic enzymes. Agroindustrial residues. Selection of fungi.*

## **1 INTRODUÇÃO**

Nas últimas décadas houve uma crescente procura pela utilização e pelo reaproveitamento de subprodutos orgânicos das atividades agroindustriais, em razão, principalmente, da necessidade de redução do uso de derivados do petróleo e da disponibilidade de grande quantidade desses resíduos. Outros fatores importantes e de grande relevância são a preocupação com os impactos que esses resíduos podem provocar ao meio ambiente e o aumento da sua própria produção, graças à elevação da população e à consequente expansão mundial das atividades agrícolas.<sup>1</sup>

No Brasil, os subprodutos ou resíduos são gerados nas diversas etapas do processo produtivo, desde o plantio até a comercialização. Hoje, partes desses subprodutos são utilizadas como fonte potencial de produção de energia para o funcionamento da própria indústria e em pesquisas, a fim de se buscarem novas fontes de energias renováveis de baixo custo. Outra parte permanece sem utilização e sua eliminação causa sérios problemas aos ecossistemas. O resíduo agroindustrial produzido para a cultura cana-de-açúcar é utilizado com eficiência quase que exclusivamente para a produção de grandes quantidades de etanol; a fabricação do álcool no país é um ramo da economia consolidado que

movimenta mais de cinco bilhões de dólares por ano em vendas e diminuiu pela metade o consumo nacional de gasolina.<sup>2</sup>

A biomassa lignocelulósica é responsável por cerca de 90% do peso seco dos vegetais<sup>3</sup> e constituída por três frações poliméricas: celulose, hemicelulose e lignina, unidas entre si por meio de ligações covalentes, compondo uma rede complexa e resistente.<sup>4</sup> Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento,<sup>5</sup> em seu segundo levantamento da produção de grãos para a safra 2013/14, o Estado do Tocantins produziu 4,7 toneladas por hectare de arroz. De acordo com a Secretaria da Agricultura e Pecuária,<sup>6</sup> em levantamento preliminar realizado em 2012/2013, a área de florestas plantadas é de 157 mil hectares, compreendendo 92% de eucaliptos, 3% de seringueira e 5% de demais espécies florestais de cunho comercial. Na Associação Brasileira de Celulose e Papel (Bracelpa),<sup>7</sup> a área de florestas plantadas para cunho industrial é de 4,5 milhões de hectares, visto que 1,8 milhões somente para celulose e papel. O Tocantins é o maior produtor de arroz da região Norte e possui filial de três das maiores empresas do setor florestal: A Suzano, a Eco Brasil e a Valor Florestal, fomentando um mercado que cresceu 35% de 2005 a 2009. A composição da madeira do eucalipto é de 48,07% de celulose, 10,42% de hemicelulose e 26,91% de lignina.<sup>8</sup> Já a composição química da palha de arroz é de 37,1% de celulose, 28,9% de hemicelulose e 3,4% de lignina.<sup>9</sup>

Foekel,<sup>10</sup> em seu levantamento, afirma que a cada 1.000 toneladas de celulose produzidas, 150 toneladas de casca de eucalipto são geradas e essa produção de resíduo foi de 3,24 milhões de toneladas em 2009. O bioprocessamento de conversão da celulose em etanol de segunda geração compreende três etapas: pré-tratamento, hidrólise (ácida ou enzimática) e fermentação da glicose em etanol. A hidrólise enzimática é promovida por várias classes de microrganismos.<sup>11</sup> O tratamento prévio da biomassa deve ser efetivo quando disponibiliza a celulose para a ação das celulasas, permite o máximo aproveitamento dos carboidratos e possibilita a redução nos custos de produção.<sup>12</sup>

As enzimas capazes de degradar a celulose são as celulasas, que atuam sinergicamente em regiões específicas da celulose, dependendo da estrutura organizacional das moléculas do polímero.<sup>13</sup> O complexo celulolítico é composto por três enzimas: endoglucanases, exoglucanases e  $\beta$ -glucosidases, atuando respectivamente nas regiões internas da cadeia celulósica, nas regiões externas e agindo diretamente no produto de outras enzimas, hidrolizando a celobiose até a glicose.<sup>14</sup> (CANILHA et al., 2010). A substituição gradativa do petróleo por combustíveis renováveis produzidos a partir de biomassa é uma estratégia promissora também pela abundância, disponibilidade e baixo custo da matéria-prima.<sup>15</sup>

Pesquisas que objetivam obter celulasas mais eficientes, em suas metodologias, incluem isolamento de fungos do gênero *Trichoderma* spp. de diversas fontes, como mexilhões, moluscos, crustáceos, cupins e até mesmo baratas.<sup>16</sup> O gênero *Trichoderma* spp., com *Penicillium*, *Aspergillus* e *Humicola* são os fungos mais utilizados na obtenção de enzimas celulasas e hemicelulasas. O cultivo em estado sólido pode ser considerado uma boa alternativa para reduzir os custos de produção, pois ele utiliza resíduos agrícolas como substratos indutores para a produção das enzimas celulolíticas, viabilizando o processo de aproveitamento da biomassa gerada.<sup>17</sup> Dessa forma, o presente trabalho

teve como objetivo avaliar isolados de fungos do gênero *Trichoderma* spp., quanto à eficiência na produção de celulases, determinando sua atividade enzimática pela quantificação de açúcares redutores produzidos ao final da incubação em biomassa lignocelulósica.

## 2 METODOLOGIA

Foram estudadas 70 estirpes de fungos do gênero *Trichoderma* spp., identificados morfológicamente por meio do microcultivo em lamínula. Os isolados foram obtidos do solo e de madeira em decomposição da região do cerrado tocantinense (Tabela 1). Os fungos isolados foram conservados em meio Potato Dextrose Ágar (Himedia) a 4 °C, no Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Tocantins, e periodicamente repicados. Nas placas foram vertidos 25 mL do meio devidamente esterilizado, acrescido de antibiótico amoxicilina 500 mg. L<sup>-1</sup> para se evitar a contaminação por bactérias.

### 2.1 DEGRADAÇÃO EM MEIO ÁGAR CARBOXIMETILCELULOSE

O cultivo das linhagens em meio contendo ágar carboximetilcelulose, para a obtenção do índice enzimático, foi baseado no proposto por Theater e Wood,<sup>18</sup> sendo realizadas três repetições. Os halos de hidrólise foram determinados com paquímetro digital. O quociente entre o halo de hidrólise e o diâmetro de crescimento da colônia é chamado de índice enzimático (i.e.), sendo este determinado para cada isolado neste estudo.

Tabela 1 – Codificação, nomenclatura e local de coleta dos isolados de *Trichoderma* spp. (continua)

<b>Código</b>	<b>Nomenclatura</b>	<b>Local de coleta</b>	<b>Código</b>	<b>Nomenclatura</b>	<b>Local de coleta</b>
UFTMG 01	1	UFT GURUPI	UFTJCO18	18L	L. CONFUSÃO
UFTMG 02	2	UFT GURUPI	UFTJCO19	19L	L. CONFUSÃO
UFTMG 03	3	UFT GURUPI	UFTJCO21	21L	L. CONFUSÃO
UFTMG 04	4	UFT GURUPI	UFTJCO22	22L	L. CONFUSÃO
UFTMG 05	5	UFT GURUPI	UFTJCO23	23L	L. CONFUSÃO
UFTMG 06	6	UFT GURUPI	UFTJCO24	24L	L. CONFUSÃO
UFTMG 07	7	UFT GURUPI	UFTJCO25	25L	L. CONFUSÃO
UFTMG 08	8	UFT GURUPI	UFTJCO26	26L	L. CONFUSÃO

(continuação)

<b>Código</b>	<b>Nomenclatura</b>	<b>Local de coleta</b>	<b>Código</b>	<b>Nomenclatura</b>	<b>Local de coleta</b>
UFTMG 09	9	UFT GURUPI	UFTJCO28	28L	L. CONFUSÃO
UFTMG 10	10	UFT GURUPI	UFTJCO32	32	L. CONFUSÃO
UFTMG 11	11	UFT GURUPI	UFTJCO33	33	L. CONFUSÃO
UFTMG 12	12	UFT GURUPI	UFTJCO36	36	L. CONFUSÃO
UFTMG 13	13	UFT GURUPI	UFTJCO37	37	L. CONFUSÃO
UFTMG 14	14	UFT GURUPI	UFTJCO38	38	L. CONFUSÃO
UFTMG 15	15	UFT GURUPI	UFTJCO41	41	L. CONFUSÃO
UFTMG 16	16	UFT GURUPI	UFTJCO45	45	L. CONFUSÃO
UFTMG 17	17	UFT GURUPI	UFTJCO46	46	L. CONFUSÃO
UFTMG 18	18	UFT GURUPI	UFTJCO48	48	L. CONFUSÃO
UFTMG 19	19	UFT GURUPI	UFTJCO49	49	L. CONFUSÃO
UFTMG 20	20	UFT GURUPI	UFTJCO56	56	L. CONFUSÃO
UFTMG 21	21	UFT GURUPI	UFTJCO57	57	L. CONFUSÃO
UFTMG 22	22	UFT GURUPI	UFTJCO63	63	L. CONFUSÃO
UFTMG 23	23	UFT GURUPI	UFTJCO67	67	L. CONFUSÃO
UFTMG 24	24	UFT GURUPI	UFTJCO76	76	L. CONFUSÃO
UFTMG 25	25	UFT GURUPI	UFTJCO78	78	L. CONFUSÃO
UFTMG 26	26	UFT GURUPI	UFTJCO79	79	L. CONFUSÃO
UFTMG 27	27	UFT GURUPI	UFTJCO80	80	L. CONFUSÃO
UFTMG 28	28	UFT GURUPI	UFTJCO85	85	L. CONFUSÃO
UFTMG 29	29	UFT GURUPI	UFTJCO86	86	L. CONFUSÃO
UFTMG 30	30	UFT GURUPI	UFTJCO87	87	L. CONFUSÃO
UFTJCO 04	04L	L. CONFUSÃO	UFTJCO92	92	L. CONFUSÃO
UFTJ- CO09	09L	L. CONFUSÃO	UFTJCO95	95	L. CONFUSÃO

<b>Código</b>	<b>Nomenclatura</b>	<b>Local de coleta</b>	<b>Código</b>	<b>Nomenclatura</b>	<b>Local de coleta</b>
UFTJ-CO10	10L	L. CONFUSÃO	UFTJCO96	96	L. CONFUSÃO
UFTJ-CO12	12L	L. CONFUSÃO	UFTJ-CO102	102	L. CONFUSÃO
UFTJ-CO14	14L	L. CONFUSÃO	UFTJ-CO111	111	L. CONFUSÃO

Fonte: os autores.

Nota: UFTMG = Universidade Federal do Tocantins, coletados de Madeira em decomposição Município de Gurupi; UFTJCO = Universidade Federal do Tocantins, coletados em solo de Várzea, Município de Lagoa da Confusão.

## 2.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE FPASE (CELULASES TOTAIS)

As linhagens foram submetidas à inoculação de quatro dias em 5 mL tampão acetado de sódio 50 mM pH 5,0 e uma fita de 6 cm<sup>2</sup> de papel filtro Whatman n. 1 em tubos de ensaio previamente esterilizados e rotulados seguindo a adaptação da metodologia proposta por Ghose.<sup>19</sup> Após a incubação, foi determinado o teor de açúcares totais por metodologia descrita por Miller.<sup>20</sup>

## 2.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE CMCASE (ENDOGLUCANASES)

Foram utilizados frascos de 100 mL contendo 5 g do substrato triturado e duplamente esterilizado em autoclave, seguindo metodologia adaptada de Ghose.<sup>19</sup> Os substratos propostos foram serragem de eucalipto e palha de arroz, umedecidos com 5 mL de água potável antes da inoculação. A concentração foi de 10<sup>5</sup>/mL esporos dos isolados para a inoculação. Os frascos permaneceram incubados por quatro dias a 28 °C, sendo realizados registros fotográficos do crescimento micelial dos fungos. Após esse período, o extrato enzimático bruto foi obtido pela adição de 50 mL de água destilada a 4 °C, nos frascos. Os substratos foram agitados em mesa agitadora a 120 rpm em 28 °C por 30 minutos e permaneceram em repouso por três horas a 4 °C. O sobrenadante foi separado por meio de filtração a vácuo, permanecendo em suporte com gelo, ou congelado, até o momento da análise. Alíquota de 0,3 mL do extrato enzimático bruto pipetada com 5,0 mL de tampão acetato 50 mM e 50 mg de carboximetilcelulose, foi levada a banho termostatizado por cinco minutos a 50 °C. A metodologia de quantificação de açúcares redutores foi feita pelo método do DNS (MILLER, 1959). Amostras de 1 mL, após 30 e 60 minutos, foram coletadas para a leitura em espectrofotômetro em  $\lambda=540$  nm.

## 2.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE FPASE NA BIOMASSA

O extrato enzimático bruto, obtido após a inoculação no resíduo lignocelulósico, foi submetido à análise de atividade enzimática em papel de filtro, usando-se uma fita de papel de filtro

Whatman n. 1 de 6 cm<sup>2</sup> em um tubo de ensaio contendo 1 mL do caldo enzimático e 1 mL de e tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. Após a incubação por 60 minutos a 50 °C, as determinações de Fpase foram realizadas como descritas anteriormente. O branco da amostra é considerado a quantidade de açúcar redutor presente em cada substrato. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-VIS. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μmol de glicose mL<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> nas condições do ensaio.<sup>21</sup>

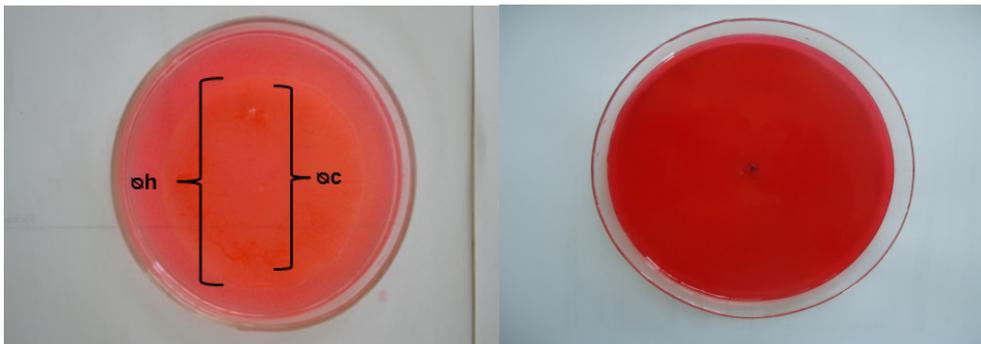
Os dados foram submetidos ao teste Anova e comparados pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando-se o programa estatístico Sisvar 5.0 desenvolvido na Universidade Federal de Lavras.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 TESTE DE GRADAÇÃO EM MEIO ÁGAR CARBOXIMETILCELULOSE (CMC)

Foram observados halos indicadores da degradação de celulose, zona mais clara ao redor das colônias, em 64 linhagens ou 91,42% dos fungos. A Tabela 2 apresenta as médias do crescimento das colônias e as médias de diâmetro de halos de degradação calculadas após três repetições. A Figura 1 mostra o comportamento observado por isolados em teste de placa.

Figura 1 – Teste de placa para a degradação de meio CMC



Fonte: os autores.

Nota: Estirpe da esquerda apresenta halo de hidrólise e da direita verifica-se ausência de halo.

Outros autores<sup>22</sup> afirmam que o índice enzimático por si só representa apenas a etapa inicial de seleção de microrganismos produtores de celulases, já que as estirpes com melhores índices enzimáticos nem sempre correspondem àquelas de maiores valores de atividade enzimática.

#### 3.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE FPASE NA BIOMASSA

Na avaliação de celulases totais durante a incubação em substrato papel-filtro com extrato enzimático obtido da biomassa palha de arroz, os isolados avaliados desempenharam atividade de

FPase que variam de 0,53 a 1,05 UI.mL<sup>-1</sup>. Os isolados 9 e 24 (2,85%) apresentaram os maiores resultados de atividade FPase com os respectivos valores 1,02 e 1,05 UI.mL<sup>-1</sup>, não se diferindo estatisticamente pelo teste de Scott-Knott com  $p < 0,05$  (Tabela 3).

Na avaliação de FPase obtida durante incubação com extrato enzimático do resíduo serragem de eucalipto, as atividades enzimáticas das estirpes variaram de 0,67 a 1,55 UI.mL<sup>-1</sup>, sendo os maiores resultados exibidos por 15,71% dos isolados (Tabela 4), que não se diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Outros autores,<sup>23</sup> trabalhando com hidrólise de bagaço de cana tratado com hidrólise ácida e alcalina, conseguiram obter atividade enzimática de FPase para *Trichoderma* spp. isolados de bioma amazônico de 0,162 UI.mL<sup>-1</sup> em comparação à atividade enzimática da enzima comercial Cellucast que foi de 0,324 UI.mL<sup>-1</sup>.

Tabela 2 – Atividade da celulase de fungos filamentosos de madeira em decomposição e do solo da região da Estação Experimental da Universidade Federal do Tocantins, em placas com meio CMC (continua)

Isolados	sc	sh	i.e.	Isolados	sc	sh	i.e.
1	18,21	20,60	1,131	18L	30,38	34,87	1,147
2	18,11	20,64	1,139	19L	29,88	31,57	1,056
3	21,62	23,55	1,089	21L	29,63	26,44	0,892
4	18,78	20,78	1,106	22L	32,70	33,78	1,033
5	21,16	23,52	1,111	23L	32,78	33,15	1,011
6	21,06	21,98	1,043	24L	35,62	36,32	1,019
7	22,33	23,09	1,034	25L	27,49	28,60	1,040
8	17,41	18,68	1,072	26L	29,14	32,10	1,101
9	24,03	24,20	1,007	28L	-	-	-
10	17,04	19,25	1,129	32	24,84	29,65	1,193
11	19,81	20,02	1,011	33	23,69	25,15	1,061
12	19,08	21,09	1,105	36	26,99	28,56	1,058
13	22,01	23,66	1,047	37	25,72	27,98	1,087
14	15,90	-	-	38	31,78	33,72	1,061
15	22,74	24,06	1,058	41	27,48	29,10	1,058
16	19,22	22,53	1,172	45	31,17	33,01	1,059
17	16,89	17,99	1,065	46	28,86	30,66	1,062
18	22,83	-	-	48	27,72	28,93	1,043
19	19,00	20,63	1,085	49	30,74	32,01	1,041
20	21,20	22,94	1,082	56	-	-	-
21	21,58	22,39	1,037	57	29,48	32,62	1,106
22	20,03	20,48	0,988	63	31,19	33,61	1,077
23	20,71	23,28	1,124	67	33,68	35,78	1,062
24	20,41	21,68	1,062	76	-	-	-
25	16,53	18,66	1,128	78	28,38	31,27	1,102

(conclusão)

Isolados	∞c	∞h	i.e.	Isolados	∞c	∞h	i.e.
26	19,94	23,95	1,201	79	26,88	30,05	1,117
27	22,55	23,18	1,027	80	-	-	-
28	16,51	17,44	1,056	85	24,86	27,34	1,099
29	28,17	20,16	1,109	86	44,64	44,91	1,006
30	18,41	20,91	1,135	87	25,42	27,89	1,097
04L	28,28	31,02	1,097	92	29,33	30,44	1,037
09L	19,09	22,32	1,169	95	39,11	40,40	1,037
10L	27,78	28,23	1,016	96	24,51	26,65	1,033
12L	31,07	32,18	1,035	102	31,68	32,20	1,087
14L	28,59	29,67	1,037	111	28,20	30,36	1,016

Fonte: os autores.

Nota: Isolados cultivados em meio sintético composto por CMC por quatro dias a 28 °C. ∞c = diâmetro de crescimento da colônia (mm), ∞h = diâmetro do halo (mm), i.e.= índice enzimático, (-) = sem produção de halo ou crescimento.

Os dados experimentais destacam o isolado 19L e a biomassa serragem de eucalipto na obtenção de FPases. As linhagens utilizadas neste estudo apresentam desempenho satisfatório, já que, frente a outros autores, a metodologia não utilizou hidrólise química previamente à hidrólise enzimática dos resíduos lignocelulósicos propostos.

Tabela 3 – Valores médios e desvio padrão das linhagens em relação à atividade de FPase com extrato enzimático obtido na biomassa palha de arroz (AFParroz) (continua)

Isolado	Variável analisada	
	A (mmol.mL <sup>-1</sup> )	U (μmol.mL <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )
5	38,02 ± 0,27 C	0,63 ± 4,52.10 <sup>-3</sup> C
6	38,49 ± 0,96 C	0,64 ± 2,26.10 <sup>-3</sup> C
8	38,56 ± 0,96 C	0,64 ± 2,72.10 <sup>-2</sup> C
9	61,53 ± 0,23 A	1,02 ± 4,00.10 <sup>-3</sup> A
12	37,70 ± 1,64 C	0,62 ± 9,88.10 <sup>-3</sup> C
13	34,94 ± 1,49 C	0,58 ± 1,60.10 <sup>-2</sup> C
14	39,04 ± 13,45 C	0,65 ± 3,90.10 <sup>-3</sup> B
15	40,97 ± 0,23 C	0,68 ± 2,49.10 <sup>-2</sup> C
17	49,83 ± 0,69 C	0,83 ± 2,24.10 <sup>-1</sup> C
18	37,86 ± 0,35 C	0,63 ± 3,92.10 <sup>-1</sup> C
20	40,43 ± 0,47 C	0,67 ± 1,15.10 <sup>-2</sup> C
21	38,95 ± 1,97 C	0,64 ± 5,96.10 <sup>-3</sup> C
22	42,59 ± 0,42 C	0,70 ± 7,99.10 <sup>-2</sup> C
23	36,75 ± 0,46 C	0,61 ± 3,29.10 <sup>-6</sup> B
24	63,12 ± 0,23 A	1,05 ± 7,16.10 <sup>-3</sup> A
26	40,90 ± 0,74 C	0,61 ± 7,74.10 <sup>-3</sup> C
27	42,98 ± 0,74 C	0,71 ± 3,83.10 <sup>-3</sup> C
28	40,51 ± 10,46 C	0,67 ± 1,24.10 <sup>-2</sup> C
30	33,77 ± 9,56 C	0,56 ± 1,13.10 <sup>-2</sup> C

(conclusão)

Isolado	Variável analisada	
	A (mmol.mL <sup>-1</sup> )	U (μmol.mL <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )
04L	32,37 ± 11,82 C	0,53 ± 1,74.10 <sup>-2</sup> C
09L	38,03 ± 9,09 C	0,63 ± 1,59.10 <sup>-2</sup> C
10L	33,04 ± 6,98 C	0,55 ± 1,97.10 <sup>-2</sup> C
18L	38,80 ± 7,13 C	0,68 ± 1,51.10 <sup>-2</sup> C
19L	42,51 ± 15,84 C	0,64 ± 1,16.10 <sup>-2</sup> C
22L	43,93 ± 14,27 C	0,70 ± 1,18.10 <sup>-1</sup> B
23L	53,37 ± 1,50 C	0,73 ± 2,64.10 <sup>-1</sup> C
24L	36,75 ± 3,47 C	0,88 ± 2,37.10 <sup>-1</sup> B
28L	31,87 ± 2,10 C	0,61 ± 2,51.10 <sup>-2</sup> C
32	36,67 ± 1,17 C	0,53 ± 5,79.10 <sup>-2</sup> C
33	36,86 ± 2,20 C	0,61 ± 3,50.10 <sup>-6</sup> C
36	42,15 ± 16,26 C	0,64 ± 1,95.10 <sup>-2</sup> C
37	50,29 ± 16,14 B	0,61 ± 3,67.10 <sup>-2</sup> B
57	40,58 ± 1,65 C	0,70 ± 2,71.10 <sup>-1</sup> C
63	39,02 ± 2,44 C	0,83 ± 2,69.10 <sup>-1</sup> C
67	41,52 ± 6,94 C	0,67 ± 2,73.10 <sup>-2</sup> C
76	45,57 ± 6,91 C	0,65 ± 4,07.10 <sup>-2</sup> C
78	37,31 ± 0,59 C	0,69 ± 1,15.10 <sup>-2</sup> C
85	39,34 ± 0,88 C	0,75 ± 1,15.10 <sup>-2</sup> B
87	37,39 ± 0,70 C	0,62 ± 9,90.10 <sup>-3</sup> C
95	37,46 ± 0,49 C	0,65 ± 1,47.10 <sup>-2</sup> C

Fonte: os autores.

Nota: Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna não diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste de Scott-Knott.

### 3.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE CMCASE (ENDOGLUCANASES)

Na determinação da atividade de endoglucanase do extrato enzimático obtido em palha de arroz, atividade enzimática apresentou valores entre 0,64 e 1,67 UI.mL<sup>-1</sup> expostos na Tabela 5. Os isolados 24 L e 20 L, com as respectivas atividades de CMCase 1,67 e 1,57 UI.mL<sup>-1</sup>, representam 2,85% dos isolados e não se diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Tabela 4 – Valores médios e desvio padrão das linhagens em relação à atividade de FPase com extrato enzimático obtido na biomassa serragem de eucalipto (AFPeucalipto)

Fungo	Variável analisada	
	A (mmol.mL <sup>-1</sup> )	U (μmol.mL <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )
1	73,38 ± 3,41 A	1,22 ± 5,68.10 <sup>-2</sup> A
2	86,56 ± 1,09 A	1,44 ± 1,81.10 <sup>-2</sup> A
3	41,64 ± 0,68 B	0,69 ± 1,13.10 <sup>-2</sup> B
9	81,06 ± 2,63 A	1,35 ± 4,38.10 <sup>-2</sup> A
14	85,74 ± 1,44 A	1,42 ± 2,41.10 <sup>-2</sup> A
15	58,87 ± 1,05 B	0,98 ± 1,75.10 <sup>-2</sup> B
17	55,06 ± 0,80 B	0,91 ± 1,34.10 <sup>-2</sup> B
18	60,68 ± 0,80 B	0,91 ± 1,34.10 <sup>-2</sup> B
20	52,55 ± 1,32 B	0,87 ± 2,20.10 <sup>-2</sup> B
23	42,09 ± 0,46 B	0,70 ± 7,69.10 <sup>-3</sup> B
24	40,17 ± 0,80 B	0,67 ± 1,33.10 <sup>-2</sup> B
25	87,34 ± 0,90 A	1,45 ± 1,50.10 <sup>-2</sup> A
30	46,16 ± 0,62 B	0,76 ± 1,04.10 <sup>-2</sup> B
09L	54,08 ± 0,96 B	0,91 ± 1,61.10 <sup>-2</sup> B
18L	39,96 ± 3,78 B	0,66 ± 6,31.10 <sup>-2</sup> B
19L	93,14 ± 0,81 A	1,55 ± 1,31.10 <sup>-2</sup> A
21L	42,09 ± 0,69 B	0,70 ± 1,16.10 <sup>-2</sup> B
22L	83,55 ± 0,72 B	1,39 ± 1,21.10 <sup>-2</sup> B
23L	43,00 ± 1,14 B	0,71 ± 1,90.10 <sup>-2</sup> B
24L	57,17 ± 0,29 B	0,95 ± 4,87.10 <sup>-3</sup> B
26L	41,99 ± 2,36 B	0,69 ± 3,94.10 <sup>-2</sup> B
37	41,08 ± 0,84 B	0,68 ± 1,40.10 <sup>-2</sup> B
38	49,84 ± 0,81 B	0,83 ± 1,36.10 <sup>-2</sup> B
45	72,26 ± 1,47 B	0,82 ± 2,45.10 <sup>-2</sup> B
46	72,26 ± 1,47 A	1,20 ± 2,45.10 <sup>-2</sup> B
57	49,24 ± 1,26 B	0,82 ± 2,10.10 <sup>-2</sup> B
63	65,28 ± 0,76 B	1,08 ± 1,26.10 <sup>-2</sup> B
67	49,79 ± 0,53 B	0,82 ± 8,93.10 <sup>-3</sup> B
76	51,96 ± 0,61 B	0,86 ± 1,02.10 <sup>-2</sup> B
78	87,94 ± 0,51 A	1,46 ± 8,57.10 <sup>-3</sup> A
79	44,37 ± 6,85 B	0,73 ± 1,14.10 <sup>-1</sup> B
80	85,38 ± 0,15 A	1,42 ± 263.10 <sup>-3</sup> A
86	42,49 ± 2,87 B	0,71 ± 4,78.10 <sup>-2</sup> B
87	84,45 ± 3,77 A	1,40 ± 6,28.10 <sup>-2</sup> A
92	41,79 ± 0,17 B	0,69 ± 2,91.10 <sup>-3</sup> B
95	88,96 ± 0,61 A	1,48 ± 1,01.10 <sup>-2</sup> A
96	42,44 ± 2,13 B	0,70 ± 3,56.10 <sup>-2</sup> B
102	80,70 ± 0,42 A	1,34 ± 7,04.10 <sup>-3</sup> A

Fonte: os autores.

Nota: Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna não diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste de Scott-Knott.

Na análise do substrato lignocelulósico serragem de eucalipto, novamente o isolado 15 apresenta maior atividade enzimática. As atividades de CMCase das estirpes variam entre 0,03 e 0,10 UI.mL<sup>-1</sup>; esta última é referente ao isolado 15 (Tabela 6). Os dados evidenciam grande variabilidade nos valores de U na determinação da atividade de endoglucanases, dependo do substrato indutor. Mandels e Reese<sup>24</sup> apresentam um modelo em que para ocorrer degradação da celulose é necessário um fator C que disponibiliza substratos para a ação de um fator C<sub>x</sub>. C não possui capacidade hidrolítica, portanto, fungos não portadores desse fator degradam apenas celulose solúvel e possuem valores de U semelhantes ao valores obtidos na testemunha. Outro fator determinante nas concentrações de CMCase obtidas em cada substrato é a composição química e física deles. Teor de celulose, hemicelulose e lignina; porosidade, granulometria, capacidade de retenção de umidade e estabilidade térmica são variáveis indicadoras de desenvolvimento de conídios e expressão de celulasas em *Trichoderma harzianum*.<sup>25</sup> A complexidade da relação enzima-substrato envolve ainda mecanismos de sinalização celular.<sup>26</sup>

Tabela 5 – Valores médios e desvio padrão das linhagens em relação à atividade de CMCase com extrato enzimático obtido na biomassa palha de arroz (ACarroz)

	Variável analisada	
	A (mmol.mL <sup>-1</sup> )	U (μmol.mL <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )
8	52,78± 0,27 C	1,26 ± 6,14.10 <sup>-3</sup> E
14	53,42± 2,54 C	1,34 ± 4,37.10 <sup>-2</sup> C
15	59,95± 3,81 B	1,42 ± 0,11 B
17	38,77 ± 2,96 E	1,03 ± 8,09.10 <sup>-2</sup> G
18	27,25 ± 3,34 G	0,68 ± 4,9.10 <sup>-2</sup> J
20	66,17 ± 1,59 B	1,57 ± 2,91.10 <sup>-2</sup> A
21	25,52 ± 2,50 G	0,64 ± 7,20.10 <sup>-2</sup> J
22	51,13 ± 1,20 C	1,20 ± 2,51.10 <sup>-2</sup> F
23	53,76 ± 3,87 C	1,22 ± 6,30.10 <sup>-2</sup> F
24	47,48 ± 0,22 D	1,19 ± 9,91.10 <sup>-3</sup> F
26	64,01 ± 8,84 B	1,53 ± 1,40.10 <sup>-1</sup> B
27	38,42 ± 0,46 B	0,94 ± 1,33.10 <sup>-2</sup> H
28	45,44 ± 0,41 D	1,01 ± 1,22.10 <sup>-2</sup> F
09L	26,31 ± 1,21 G	0,70 ± 3,81.10 <sup>-2</sup> J
12L	70,54 ± 0,86 A	1,09 ± 1,95.10 <sup>-2</sup> B
19L	49,57 ± 0,86 D	1,09 ± 1,95.10 <sup>-2</sup> G
23L	47,31 ± 0,84 D	1,15 ± 1,78.10 <sup>-2</sup> F
24L	71,30 ± 0,19 A	1,67 ± 3,51.10 <sup>-3</sup> A
32	33,15 ± 0,84 F	0,81 ± 1,63.10 <sup>-2</sup> I
57	63,30 ± 1,31 B	1,46 ± 2,48.10 <sup>-2</sup> D

Fonte: os autores.

Nota: Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna não diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste de Scott-Knott.

Tabela 6 – Valores médios e desvio padrão das linhagens em relação à atividade de CMCase com extrato enzimático obtido na biomassa serragem de eucalipto (ACeucalipto)

Fungo	Variável analisada	
	A (mmol.mL <sup>-1</sup> )	U (μmol.mL <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )
1	2,34 ± 0,17 B	0,05 ± 4,89.10 <sup>-3</sup> B
2	1,66 ± 0,05 D	0,05 ± 1,45.10 <sup>-3</sup> C
3	1,80 ± 0,06 D	0,04 ± 2,07.10 <sup>-3</sup> B
9	1,93 ± 0,11 C	0,04 ± 3,33.10 <sup>-3</sup> B
13	1,78 ± 0,10 D	0,04 ± 3,27.10 <sup>-3</sup> C
14	1,54 ± 0,10 E	0,04 ± 3,78.10 <sup>-3</sup> C
15	3,83 ± 0,21 A	0,10 ± 2,84.10 <sup>-3</sup> A
17	1,68 ± 0,03 D	0,04 ± 1,73.10 <sup>-3</sup> C
18	1,50 ± 0,10 E	0,04 ± 2,62.10 <sup>-3</sup> C
20	1,44 ± 0,19 E	0,03 ± 5,89.10 <sup>-3</sup> C
09L	1,60 ± 0,01 D	0,04 ± 14,86.10 <sup>-4</sup> C
22L	1,42 ± 0,08 E	0,03 ± 2,39.10 <sup>-3</sup> C
24L	1,32 ± 0,12 E	0,03 ± 3,20.10 <sup>-3</sup> C
45	1,53 ± 0,10 E	0,03 ± 1,73.10 <sup>-3</sup> C
63	1,57 ± 0,07 D	0,03 ± 1,73.10 <sup>-3</sup> C
76	2,31 ± 0,37 C	0,06 ± 1,27.10 <sup>-2</sup> A
78	1,36 ± 0,38 E	0,03 ± 1,25.10 <sup>-2</sup> C
80	1,76 ± 0,19 D	0,04 ± 4,97.10 <sup>-3</sup> C
87	1,97 ± 0,14 C	0,04 ± 3,67.10 <sup>-3</sup> B
95	1,94 ± 0,05 C	0,017 ± 1,23.10 <sup>-3</sup> B
102	1,63 ± 0,08 D	0,017 ± 2,78.10 <sup>-3</sup> C

Fonte: os autores.

Nota: Médias seguidas da mesma letra maiúscula na coluna não diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade de erro pelo teste de Scott-Knott.

A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos durante a avaliação da atividade enzimática de CMCase e FPase nos substratos propostos.

Tabela 7 – Resultados dos ensaios realizados na avaliação de FPase e CMCase

Avaliação	Isolados (%)	Atividade enzimática máxima (UI)	C.V (%)	R <sup>2</sup>
ACFPase	70	0,017	0,09	0,9815
AFarroz	2,85	1,05	17,85	0,9862
AFeucalipto	15,71	1,55	18,85	0,9898
ACarroz	2,85	1,67	5,05	0,9953
ACeucalipto	0,70	0,10	12,40	0,9950

Fonte: os autores.

Nota: ACFPase = atividade de FPase das linhagens inoculadas somente em papel filtro; AFarroz = atividade de FPase com substrato enzimático obtido da inoculação em palha de arroz; ACarroz = atividade enzimática de CMCase do extrato obtido da inoculação em palha de arroz; AFeucalipto = atividade de FPase com substrato enzimático obtido da inoculação em serragem de eucalipto; ACeucalipto = atividade enzimática de CMCase do extrato obtido da inoculação em serragem de eucalipto; UI = μmol de açúcar redutor formado por mililitro por minuto, significativo ao nível de 5% de probabilidade de erro; C.V. = coeficiente de variação; R<sup>2</sup> = coeficiente de correlação da curva analítica não linear.

## 4 CONCLUSÃO

As linhagens utilizadas neste estudo apresentam características morfológicas (estrutura de conídios, corpo micelial, esporos e hifas) fundamentadas em teste de microcultivo em lamínula como sendo do gênero *Trichoderma* spp.

O substrato serragem de eucalipto é um potencial indutor na produção de celulases totais, sendo o isolado UFTJCO19 o que apresentou extrato enzimático com maior atividade. O substrato palha de arroz é um potencial indutor de endoglucanases para os isolados utilizados neste estudo, sendo o isolado UFTJCO24 o que apresentou extrato enzimático e atividade enzimática máxima. Não foram observadas diferenças consideráveis quanto à produção de celulases entre fungos isolados do solo e fungos isolados de madeira em decomposição. A bioprospecção de novos microrganismos produtores de celulases bem como o entendimento do mecanismo de especificidade de cada enzima atuando no respectivo substrato são fatores determinantes na redução de custos e otimização da produção de bioprodutos, incluindo biocombustíveis.

## REFERÊNCIAS

1. Gonzales ADG, Lima JM, Vital AV, Rodrigues MBS. Desenvolvimento sustentável para o resgate da cultura do cacau baseado no aproveitamento de resíduos. *Interfaces Científicas: Saúde e Ambiente*. 2007; 1(2):41-52.
2. Rosillo-Calle F, Bayay SN, Rothman H. *Uso da biomassa para a produção de Energia na Indústria Brasileira*. São Paulo: Ed. Unicamp; 2008.
3. Iranmahboob J, Nadim F, Monemi, S. Optimizing acid-hydrolysis: a critical step for production of ethanol from mixed wood chips. *Biomass and Bioenergy*. 2002;22:401-4.
4. Sanchez OJ, Cardona, CA. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Biosource Technology*. 2008;99(18):5270-95.
5. Companhia Nacional de Abastecimento. [online]. Brasília, DF; Brasil; 2013. [capturado em 10 nov. 2013] Disponível em <http://www.conab.gov.br/>
6. Secretaria da Agricultura e Pecuária. [online]. Palmas; Brasil; 2013. [capturado em 10 nov. 2013] Disponível em <http://seagro.to.gov.br/>
7. Associação Brasileira de Celulose e Papel. [online]. Brasília, DF; Brasil; 2011. [capturado em 10 nov. 2013] Disponível em <http://www.bracelpa.org.br/pt/>
8. Carroll, A, Somerville C. Cellulosic biofuels. *Annual Review of Plant Pathology*. 2009;60:165-82.
9. Silva LP, Silva LS, Bohnen, H. Componentes da parede celular e digestibilidade *in vitro* de palha de arroz (*Oryza sativa*) com diferentes teores de silício. *Ciência rural*. 2005 Set-Out; 35(5):1205-08.

10. Foekel, C. A casca da árvore do eucalipto. [online]. 2013. [capturado em 10 nov. 2013] Disponível em <http://www.eucalyptus.com.br>
11. Lomeier-Voger EM, Sopher CR, Lee H. Intracellular acidification as a mechanism for the inhibition by acid hydrolysis- derived inhibitors of xylose fermentation by yeasts. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 1998;20:75-85.
12. Moiser N, Wynman C, Dale B, Elander R, Lee YY, Hotzapple M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biosource Technology*. 2005;96:673-86.
13. Eriksson T, Karlsson J, Jernelid, FA. A model explaining declining rate in hydrolysis of lignocellulose substrate with cellobiohydrolase I (CelA) and endoglucanase I (Cel 7B) of *Trichoderma reesei*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2002;101:41-60.
14. Canilha L, Milagres AMF, Silva SS, Silva JBA, Felipe MGA, Rocha GJM et al. Sacarificação da biomassa lignocelulósica através de pré-hidrólise ácida seguida por hidrólise enzimática: uma estratégia de desconstrução da fibra vegetal. *Revista Analytica*. 2010;44:48-54.
15. Berlin A, Balakshin M, Gilkes N, Kadla J, Maximenko V, Kubo, S. et al. Inhibition of cellulase, xylanase and glucosidase activities by softwood lignin preparations. *Journal of Biotechnology*. 2006;125:198-209.
16. Sallenave-Namont C, Pouchus YF, Roubiou du P, Lassius, P, Verbist JF. Toxigenic saprophytic fungi in marine shellfish farming areas. *Mycopathologia*. 2000;149:21-5.
17. Florencio C, Farinas CS. Microrganismos Produtores de Celulases: Seleção de Isolados de *Trichoderma* spp. In: Anais da 3ª Jornada Científica Embrapa; 2009; São Carlos, Brasil. São Carlos; 2009.
18. Theater RM, Wood PJ. Use of congo red-Polysaccharide interations in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology*. 1982;43(4):777-80.
19. Ghose TK. Measurement of cellulose activities. *Pure and Applied Chemistry*. 1987;59:257-68.
20. Miller GH. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Annals of Chemistry*. 1959;31:426-9.
21. Ruegger MJS, Tauk-Tornisielo SM. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins. São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*. 2004;27(2):205-11.
22. Ten, LN, Im WT, Kim MK, Kang MS, Lee, ST. Development of a plate technique for screening polysaccharide-degrading microorganisms by using of insoluble chromogenic substrates. *Journal of Microbiological Methods*. 2004;56:375-82.
23. Scheufele FB, Butzke AS, Marra IF, Hasan SDM, Fiorese ML. Otimização dos parâmetros de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. *Engenharia*. 2012;14(3):310-21.

24. Mandels M, Reese ET. Induction of celulase in fungi by cellobiose. *Journal Bacteriology*. 1960;79:816-26.
25. Omero CJ, Inbar V, Rocha-Ramírez A, Herrera-Estrella I, Chet BA, Horwitz G. Proteins activators and camp promote mycoparasitic behavior in *Trichoderma harzianum*. *Mycological Reserchv*. 103, p. 1637-1642, 1999.
26. ROCHA-RAMIREZ, V.; OMERO,C.; CHET, I., HORWITZ, A. Trichoderma autoviride G-protein alpha subunit gene tgal is involved in mycoparasitic coiling and conidiation, ***Eukaryot Cell***. 2002;1:594-605.

Recebido em 07 de julho de 2014

Aceito em 23 de outubro de 2014