



## Bioprospecção de linhagens de *trichoderma sp.* na degradação de resíduos lignocelulósicos de sabugo de milho

### *Bioprospecting of trichoderma sp. strains the degradation lignocellulosic waste corn cobs*

Damiana Beatriz da Silva<sup>1</sup>, Aloísio Freitas Chagas Junior<sup>2</sup>, Aquiles Rhuan Bandeira Neres Pinheiro<sup>3</sup>, Lílían França Chagas<sup>4</sup>, Marcos Giongo<sup>5</sup>

**RESUMO** - O Brasil é um grande produtor agrícola, e nos últimos anos a área plantada teve grande crescimento o que determina diretamente na quantidade de resíduos agroindustriais gerados. O etanol é um biocombustível de larga utilização e pode ser obtido de matérias primas que contenham açúcares ou polímeros de açúcares como os materiais lignocelulósicos após passarem por processo de hidrólise enzimática. Os 70 isolados disponíveis foram submetidas a identificação prévia por microcultivo em lâmina, teste de solubilização de carboximetilcelulose (CMC) em placa e avaliadas na degradação de sabugo de milho para produção enzimática. Das 70 estirpes, 66 tem fortes características morfológicas do gênero *trichoderma* segundo teste de microcultivo em lâmina e os isolados UFTJCO85 e UFTMG15 apresentaram as maiores atividades enzimáticas com 1,34 UI.mL<sup>-1</sup> para FPase e 0,81 UI.mL<sup>-1</sup> para CMCase, sem tratamento prévio no substrato.

**Palavras chave:** resíduos agroindustriais, *Trichoderma sp.*, atividade enzimática, produção de biocombustíveis.

**ABSTRACT** - Brazil is a major agricultural producer, and in recent years the acreage had great growth which directly determines the amount of agro-industrial waste generated. Ethanol is a biofuel widely used and can be obtained from raw materials containing sugars or sugar polymers such as lignocellulosic material after undergoing enzymatic hydrolysis process. The 70 strains were subjected to prior identification in coverslip microculture, solubilization test of carboxymethylcellulose (CMC) plate and evaluated in the degradation of corn cobs for enzyme production. Of the 70 strains, 66 have strong morphological characteristics of the genus *Trichoderma* second test microcultive in coverslip and isolates 85 and 15 had the highest enzymatic activities UI.mL<sup>-1</sup> with 1.34 and 0.81 for FPase UI.mL<sup>-1</sup> for CMCCase without treatment on the substrate.

**Keywords:** agro-industrial residues, *Trichoderma sp.*, enzymatic activity, production of biofuels.

\*Autor para correspondência

Recebido para publicação em 11/07/2014; aprovado em 25/02/2015

<sup>1</sup>Mestre em Biotecnologia-Universidade Federal do Tocantins, Laboratório de Análises de Solos, Gurupi, TO. E-mail: damisb@uft.edu.br

<sup>2</sup>Professor Adjunto III do Programa de Pós graduação em Biotecnologia, Orientador do manuscrito, Laboratório de Microbiologia-UFT Gurupi, TO. E-mail: chagasjr@uft.edu.br

<sup>3</sup>Acadêmico do Curso de Agronomia, Laboratório de Microbiologia-UFT Gurupi, TO. E-mail: rhuan@uft.edu.br

<sup>4</sup>Doutoranda em Produção Vegetal, Laboratório de Microbiologia-UFT, Gurupi, TO. E-mail: lilian.franca@uft.edu.br

<sup>5</sup>Professor Adjunto III do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Interpretação de dados, Laboratório de Ciências Florestais-UFT Gurupi/TO, e-mail: giongo@uft.edu.br

## INTRODUÇÃO

No Brasil são produzidos por ano 606 milhões de toneladas de resíduos agroindustriais, compostos em grande parte por celulose (CASTRO e PEREIRA JR, 2007). Matérias-primas lignocelulósicas constituem a maior fonte natural de carboidratos, representando mais de 90% do peso seco vegetal, sendo constituídas por três frações poliméricas: lignina, hemicelulose e celulose, unidas por ligações químicas. (BON et al., 2008)

O Estado do Tocantins é o maior produtor de grãos da região Norte do Brasil, disponibilizando biomassa lignocelulósica em todas as etapas do processo produtivo. De acordo com a CONAB (Compania Nacional de Abastecimento), em seu décimo segundo levantamento, a área plantada para a safra 2012/2013 de milho foi de 92,5 mil hectares (CONAB, 2012). O sabugo de milho é um substrato de baixo custo, disponível em larga escala, capaz de fornecer elementos orgânicos e inorgânicos para crescimento e nutrição de microrganismos (LADEIA, 2013). A composição química do sabugo de milho segundo Santos, et al. (2013), é de 45% celulose, 35% hemicelulose e 15% de lignina (SANTOS et al., 2013).

A sacarificação da celulose é parte do bioprocessamento de produção de etanol de segunda geração, ou etanol 2G, e se dá por duas vias: química (ácidos diluídos ou concentrados) e enzimática utilizando celulases produzidas por microrganismos como *Trichoderma reesei* (OLOFSSON, et al., 2008). Celulases e xilanases são enzimas com alto valor agregado, importante em diversos processos biotecnológicos (BHAT, 2000). Degradação da celulose na fabricação de biocombustíveis, porém o teor de lignina presente no resíduo a ser hidrolizado, é responsável pela diminuição da ação enzimática microbiana (BERLIN et al., 2006).

As moléculas de celulose formam pontes de hidrogênio inter e entre as cadeias justapostas de glicose, justificando a insolubilidade da celulose. Essa organização estrutural é responsável pela cristalinidade da celulose, determinando a facilidade ou dificuldade de atuação das celulases (OGEDA e PETRI, 2010). O complexo celulolítico de *Trichoderma reesei*, vem sendo largamente investigado, pois clivam ligações glicosídicas, sendo classificadas de acordo com a região da celulose em que atuam. As endoglucanases clivam as regiões internas, as exoglucanases ou celobiohidrolases, clivam as regiões externas e as  $\beta$ -glucosidases hidrolisam aos produtos da atuação das enzimas anteriores, resultando em glicose (LEE e MOON, 2003). Lynd et al. (2002), afirma que o processo de sacarificação de biomassa lignocelulósica deve considerar que as  $\beta$ -glucosidases e as exoglucanases sofrem inibição de seu próprio produto, comprometendo o rendimento na produção de bioprodutos como o etanol (LYND et al., 2002).

O pré-tratamento desse resíduo, para liberação da celulose ao ataque enzimático, bem como a escolha do tipo de fermentação, também são determinantes na viabilidade

econômica do bioprocessamento produtivo na obtenção de biocombustíveis (HERNANDEZ et al., 2005).

Este estudo tem como objetivo avaliar o sabugo de milho como fonte de carbono e substrato indutor de celulases produzidas por fungos *Trichoderma spp.*, isolados do cerrado Tocantinense.

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram estudadas 70 estirpes de fungos do gênero isoladas do solo e de madeira em decomposição da região do cerrado tocantinense (tabela 01). Os fungos isolados foram conservados em meio PDA (39g.L<sup>-1</sup>) 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 para se evitar a contaminação.

### Identificação dos isolados

Para confirmação que os fungos isolados eram do gênero *Trichoderma spp.*, fez-se o microcultivo em lâmina de cada estirpe, analisando suas características morfológicas em microscópio, através da obtenção de registros fotográficos das hifas e corpos de frutificação, comparando os mesmos a descrições observadas no livro *Illustrated General of Imperfect Fungi*, dos autores H.L. Barnett e Barry B. Hunter, 1989 (BARNETT e HUNTER, 1989).

### Teste de degradação em meio ágar-carboximetilcelulose

Para o teste de degradação em CMC, fez-se o cultivo das linhagens em meio contendo ágar carboximetilcelulose (CMC), para obtenção do índice enzimático como proposto por Teather e Wood (1982). Com auxílio de paquímetro digital obteve-se os diâmetros de crescimento das colônias e dos halos de hidrólise produzidos, o cálculo do índice enzimático (i.e.).

### Determinação da atividade de celulases totais (FPase)

O extrato enzimático bruto, obtido após a inoculação no resíduo lignocelulósico, foi submetido à análise de atividade enzimática em papel de filtro de acordo com Ghose, (1987) usando-se uma fita de papel filtro Whatman nº 01 de 6cm<sup>2</sup> em um tubo de ensaio contendo 1,0 mL do caldo enzimático e 1,0 mL de tampão acetato de sódio 50 mM, pH 5,0. Após incubação por 60 min a 50 °C, a determinação de açúcares redutores totais (ART), seguiu a metodologia proposta por Miller (1959). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro ( $\lambda = 540\text{nm}$ ) após banho fervente para o desenvolvimento de cor, e o branco do ensaio é considerado aquele obtido do extrato enzimático das testemunhas.

**Tabela 01** - Codificação, nomenclatura e local de coleta dos isolados

Código	Nomenclatura	Local de coleta	Código	Nomenclatura	Local de coleta
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
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
UFTJCO09	09L	L. CONFUSÃO	UFTJCO95	95	L. CONFUSÃO
UFTJCO10	10L	L. CONFUSÃO	UFTJCO96	96	L. CONFUSÃO
UFTJCO12	12L	L. CONFUSÃO	UFTJCO102	102	L. CONFUSÃO
UFTJCO14	14L	L. CONFUSÃO	UFTJCO111	111	L. CONFUSÃO

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.

#### Determinação da atividade de endoglucanase (CMCase)

No processo de fermentação em estado sólido (FES) para produção do extrato enzimático, utilizou-se como biomassa sabugo de milho triturado, fornecido pelo grupo de pesquisa de melhoramento genético de sementes da Universidade Federal do Tocantins. Foram utilizados frascos de 100 mL contendo 5,0 g do substrato triturado e duplamente esterilizado em autoclave, seguindo metodologia adaptada de Ghose (1987). Os frascos permaneceram incubados por 4 dias a 28 °C e registros fotográficos feitos a cada 24 horas. Após este período, o extrato enzimático bruto foi obtido pela adição de 50 mL de água destilada a 4° C, nos frascos. Os frascos foram agitados em mesa agitadora e permaneceram em repouso por 3 h a 4 °C. O sobrenadante foi separado através de filtração a vácuo, permanecendo em suporte com gelo ou congelados até o momento da análise em frascos de vidro tampados e previamente rotulados. Alíquota de 0,3 mL do extrato enzimático bruto foram pipetadas com 5,0 mL de tampão acetato 50 mM e 50 mg de carboximetilcelulose, foram levados a banho termostatizado por 5 min a 50 °C. A reação foi interrompida pelo acréscimo de 1,0 mL do reagente de Sumner (ácido 3,5 dinitro salicílico: 10,0 g.L<sup>-1</sup>; NaOH: 16,0 g.L<sup>-1</sup>; tartarato duplo de sódio e potássio: 300,0 g.L<sup>-1</sup>).

Todos os tubos foram centrifugados por 10 min a 3.000 rpm e os sobrenadantes transferidos para tubos de ensaio previamente rotulados, os quais permaneceram por 5 min em banho-maria de água fervente para desenvolver a cor, sendo resfriados em banho de água fria e acrescentando-se 10 mL de água destilada. Amostras de 1,0 mL, após 30 e 60 min, foram coletadas para leitura em espectrofotômetro em  $\lambda=540$  nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 mmol de glicose mL<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> nas condições do ensaio (UI =  $\mu\text{mol mL}^{-1} \text{min}^{-1}$ ) (RUEGGER e TAUKE-TORNISIELO, 2004).

Os dados foram submetidos ao teste ANOVA e comparados pelo teste de Scott-Knott a 5% probabilidade utilizando-se o programa estatístico Sisvar.

#### RESULTADOS E DISCUSSÃO

Willians et al. (1983), descreve as colônias do *Trichoderma* sp. com sendo de rápido crescimento, apresentando micélio esbranquiçado (ou amarelado), dando origem a conidióforos agregados, ramificados em tufo. Os conidióforos deste gênero são irregularmente verticilados, muitas vezes irregularmente dobrados, com alongamentos de hifas estéreis, fiáldes em forma de balão, ovóide, em cachos

terminais pequenos, geralmente facilmente reorganizada pelo seu rápido crescimento, colônias brancas ou branco-verde com verde. A figura 01 mostra isolado 08 em teste de microcultivo.

Foram observados halos indicadores da degradação de celulose, zona mais clara ao redor das colônias, em 64 linhagens ou 91,42 % dos fungos como mostra a tabela 02. Nogueira e Cavalcanti (1996), a adição de 0,5 g de asparagina, tem sido alternativa capaz de gerar aumento do

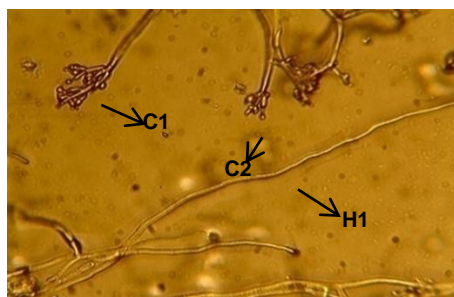
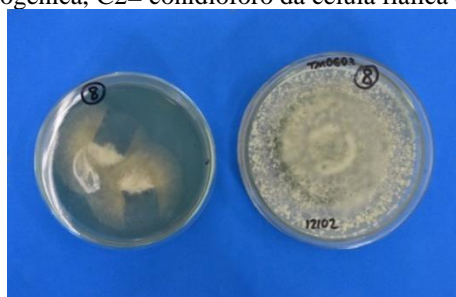
percentual de estirpes que apresentem índice enzimático considerável. Os maiores índices enzimáticos entre todos os fungos estudados, foram os dos isolados 26, 32L, 16, 09L e 18L, com valores, respectivamente de 1,201; 1,193; 1,172; 1,169 e 1,147. Faheina Junior (2010) analisando o isolado *Trichoderma* sp. LCB 79, obteve índice enzimático de 1,09 e de 4,35 para *Fusarium* sp. SAP09. Ruegger e Tauk Tornisielo (2004) encontraram valores de índice enzimáticos de até 6,00 para *Trichoderma* e *Penicillium*.

**Tabela 02-** Atividade da celulase de fungos filamentosos de madeira em decomposição e do solo da região da Estação Experimental da Universidade Federal do Tocantins

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
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

Isolados cultivados em meio sintético composto por CMC por 4 dias a 28 °C. sc= diâmetro de crescimento da colônia (mm), sh= diâmetro do halo (mm), i.e.= índice enzimático, (-) = sem produção de halo ou crescimento.

**Figura 01** - A esquerda isolado 08 e placa para microcultivo após 48 horas de crescimento em lamínula e a direita estruturas observadas em microscópio dando fortes indícios de se tratar de um *Trichoderma* sp. onde C1= conidióforo da célula conidiogênica, C2= conidióforo da célula filial e H1= hifa.



**Figura 02** - A esquerda isolado 23 e placa para microcultivo após 48 horas de crescimento em lamínula e a direita estruturas observadas em microscópio dando fortes indícios de não se tratar de *Trichoderma* sp.



O halo indicador da degradação da carboximetilcelulose (CMC), não foi observado em quatro isolados, ou seja, 2,80 % dos fungos, isso pode ter sido ocasionado pela presença de substâncias químicas do meio, podendo provocar ainda, a inibição das ligações deste aos polissacarídeos ou a precipitação do mesmo na placa (CASTRO, 2006). Em dois isolados: 76 e 80, não foi possível determinar o índice enzimático porque seu crescimento de colônia tomou toda extensão da placa.

Na avaliação de celulases totais durante a incubação em substrato papel filtro com extrato enzimático obtido da biomassa sabugo de milho, a atividade de FPase variou de 0,56 a 1,34 UI.mL<sup>-1</sup>. Os isolados 14, 15, 16 e 85 ( 5,71%) não se diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott ( p < 0,05) com as atividades 1,30; 1,18; 0,76 e 1,34 UI.mL<sup>-1</sup> respectivamente (Tabela 03). Scheufele et al. (2012), trabalhando com hidrólise de bagaço de cana tratado com hidrólise ácida e alcalina, conseguiram obter atividade enzimática de FPase para *Trichoderma* sp. isolados de bioma amazônico de 0,162 UI.mL<sup>-1</sup> em comparação a atividade enzimática da enzima comercial CELLUCAST que foi de 0,324 UI.mL<sup>-1</sup>. Rodriguez-Zuñing et al. (2011), em seus estudo com *Trichoderma reesei* inoculado em farelo de trigo obteve 0,430 UI.mL<sup>-1</sup> de atividade de FPase. Munir et al. (2007), descrevem 0,77 UI.mL<sup>-1</sup> de atividade FPase de fungos *Trichoderma harzianum*, em biomassa de farelo de arroz. As linhagens utilizadas neste estudo apresentam desempenho satisfatório já que, frente a outros autores, a metodologia não utilizou de hidrólise ácida previamente à hidrólise enzimática.

Em se tratando da biomassa sabugo de milho quanto a atividade de CMCCase, os valores obtidos variam entre 0,39 e 0,81 UI.mL<sup>-1</sup> (Tabela 04), os isolados 15 e 02 desempenharam os maiores resultados de atividade enzimática, se diferenciando estatisticamente pelo teste de Scott-Knott (p < 0,05) com os valores 0,81 e 0,78 UI.mL<sup>-1</sup>, respectivamente. Khan et al. (2007) analisando atividade de CMCCase de *Trichoderma reesei* obtiveram 0,70 UI.mL<sup>-1</sup>. Hargreaves (2008), em seus ensaios com isolados inoculados em bagaço de cana previamente hidrolisado obteve 1,51 UI.mL<sup>-1</sup> para atividade de endoglucanases. Adsul,et al. (2004), comparou atividade de endoglucanase em resíduo lignocelulósico antes e depois de tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10% encontrando as respectivas atividades de CMCCase 0,28 UI.mL<sup>-1</sup> e 0,62 UI.mL<sup>-1</sup>. Munir et al. (2007), utilizou como substrato farelo de arroz e o fungo *Trichoderma harzianum*, e descreve a avaliação de atividade de endoglucanase de até 1,90 UI.mL<sup>-1</sup> e de 0,32 UI.mL<sup>-1</sup> para *Trichoderma* sp. no mesmo substrato. Os dados evidenciam grande variabilidade nos valores de U na determinação da atividade de endoglucanases, dependendo do substrato indutor. Mandels e Reese (1960) apresentam um modelo em que para ocorrer degradação da celulose é necessário um fator C que disponibiliza substratos para 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.

**Tabela 03** - Valores médios e desvio padrão das linhagens em relação à atividade de FPase com extrato enzimático obtido na biomassa sabugo de milho (AFPsabugo).

Fungo	A (mmol.mL <sup>-1</sup> )	Variável analisada	U (μmol.mL <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> )
1	41,44 ± 3,82 C		0,69 ± 6,36.10 <sup>-2</sup> C
2	79,51 ± 0,42 A		0,62 ± 7,00.10 <sup>-3</sup> B
7	37,79 ± 0,67 C		1,03 ± 9,55.10 <sup>-3</sup> C
14	61,69 ± 0,57 B		1,30 ± 1,91.10 <sup>-2</sup> A
15	78,15 ± 1,15 A		1,18 ± 6,68.10 <sup>-2</sup> A
16	71,06 ± 4,00 A		0,76 ± 1,47.10 <sup>-2</sup> A
18	45,66 ± 5,68 C		0,76 ± 9,47.10 <sup>-2</sup> C
22	45,62 ± 5,68 C		0,76 ± 6,50.10 <sup>-1</sup> C
28	57,98 ± 38,80 B		0,96 ± 1,87.10 <sup>-2</sup> B
29	49,66 ± 1,12 C		0,82 ± 1,67.10 <sup>-2</sup> C
36	38,98 ± 1,00 C		0,64 ± 7,97.10 <sup>-3</sup> C
37	35,97 ± 0,47 C		0,59 ± 1,32.10 <sup>-1</sup> C
41	39,29 ± 1,71 C		0,65 ± 2,85.10 <sup>-2</sup> C
49	33,91 ± 7,96 C		0,56 ± 1,30.10 <sup>-1</sup> C
78	47,92 ± 2,03 C		0,79 ± 3,39.10 <sup>-2</sup> C
85	80,85 ± 0,32 A		1,34 ± 5,45.10 <sup>-2</sup> A
86	40,39 ± 8,38 C		0,67 ± 1,30.10 <sup>-1</sup> C
87	44,45 ± 1,83 C		0,74 ± 3,00.10 <sup>-1</sup> C

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

Os resultados obtidos estatisticamente encontram-se resumidos na tabela 05, que trata das avaliações separadamente incluindo o percentual de fungos que desempenharam os maiores resultados.

**Tabela 04** - Valores médios e desvio padrão das linhagens em relação à atividade de CMCase com extrato enzimático obtido na biomassa sabugo de milho (ACsabugo)

Fungo	A ( $\text{mmol.mL}^{-1}$ )	Variável analisada	U ( $\mu\text{mol.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$ )
2	27,23 ± 0,04 B		0,78 ± 3,09.10 <sup>-3</sup> B
14	22,54 ± 0,15 E		0,62 ± 4,46.10 <sup>-3</sup> E
15	29,25 ± 0,29 A		0,81 ± 6,55.10 <sup>-3</sup> A
16	23,67 ± 2,96 D		0,62 ± 1,30.10 <sup>-2</sup> D
20	14,92 ± 0,14 G		0,39 ± 6,20.10 <sup>-3</sup> G
28	25,95 ± 0,26 C		0,72 ± 4,67.10 <sup>-3</sup> C
85	20,92 ± 0,17 F		0,58 ± 2,12.10 <sup>-3</sup> F

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 05**- Resultados dos ensaios realizados na avaliação de FPase e CMCase

Avaliação	Isolados (%)	Atividade enzimática máxima ( $\text{UI.mL}^{-1}$ )	C.V (%)	R <sup>2</sup>
ACFPase	70	0,017	0,09	0,9815
AFsabugo	5,71	1,34	18,85	0,9886
ACsabugo	2,85	0,81	0,89	0,9886

ACFPase= atividade de FPase das linhagens inoculadas somente em papel filtro; AFSabugo= atividade de FPase com substrato enzimático obtido da inoculação em sabugo de milho; ACSabugo= atividade enzimática de CMCase do estrato obtido da inoculação em sabugo de milho; UI= $\mu\text{mol}$  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.

## CONCLUSÕES

A atividade enzimática depende do substrato avaliado e diferentes parâmetros e métodos, impossibilitam uma comparação efetiva com outros autores.

As estirpes isoladas do solo e de madeira em decomposição apresentaram desempenho semelhante quanto à atividade enzimática.

O mecanismo de hidrólise enzimática é desconhecido e a atuação sinérgica das celulases depende das características físico-químicas do substrato, do tratamento prévio no substrato do tipo de fermentação.

## AGRADECIMENTOS

Ao coordenador do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Tocantins Prof. Dr. Gessiel Newton Scheidt e à técnica de laboratório Luciana Gonçalves da Mata por suas contribuições a este trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADSUL, M.G.; GHULE, J.E.; SINGH, R.; SHAIKH, H.; BASTAWEDA, K.B.; GOKHALE, D.V. VARMA,A.J. Polysaccharides from bagasse application in cellulose, and xylanase production. **Carbohydrate Polymeres**. v. 57, p. 67-72, 2004.
- BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. **Published by the American Phytopathological Society**, 1987.
- BERLIN, A.; BALAKSHIN, M.; GILKES, N.; KADLA, J.; MAXIMENKO, V.; KUBO, S.; SADDLER, J. Inhibition of cellulase, xylanase and glucosidase

activities by softwood lignin preparations. **Journal of Biotechnology**, v. 125, p. 198-209, 2006.

BHAT, M.K. Cellulases and related in biotechnology. **Biotechnology Advanced**. v.18, p. 355-383, 2000.

BON, E.P.S.; FERRARA, M.A.; CORVO, M.L. Enzymas em Biotecnologia: produção aplicações e mercado. Rio de Janeiro, 2008.

CASTRO, A. M. **Produção e propriedades de celulases de fungos filamentosos, obtidas a partir de celullignina de bagaço de cana-de-açúcar (Saccharum spp.)**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2006.

CASTRO, A.M.; PEREIRA JR., N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**, v.33, p. 181-188, 2010.

CASTRO, A.M.; PEREIRA JR., N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. **Química Nova**. v.33, p. 181-188, 2007.

GHOSE, T.K. Measurement of cellulose activities. **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, p. 257-268, 1987.

HARGREAVES, P.I. Bioprospecção de novas Celulases de fungos provenientes da Floresta Amazônica e otimização de sua produção sobre celullignina de bagaço de cana. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

- Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Processos Químicos, 2008.
- HERNANDEZ, M.S.; RODRIGUEZ, M.R.; GUERRA, N.R.; ROSES, R.P. Amylase production by *Aspergillus niger* submerged cultivation on two wastes from food industries. **Journal of Food Engineering**. n. 33, p. 275-280, 2005.
- KHAN, M.H.; ALI, S.; FAKHRU'L-RAZI, A.; ALAM, Z. Use of fungi for the bioconversion of rice straw into cellulases enzyme. **Journal of Environmental Science and Health Part B: Pesticides, Food, Contaminantes and Agricultural Wastes**, v. 42, p. 381-386, 2007.
- LADEIRA, S.A. Aproveitamento de resíduos agroindustriais para produção de celulases e xilanases por *Bacillus spp.* Tese de Doutorado. Universidade Estadual Norte Fluminense. 164 p., 2003.
- LEE, K.; MOON, S.H. Electroenzymatic oxidation of ventryl alcohol by lignina peroxidase. **Journal of Biotechnology**. n. 102, p. 261-268, 2003.
- LYND, L.R.; WEIMER, P.J.; VAN-ZYL, W.H.; PRETORIUS, I.S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**. v.66, p. 506-577, 2002.
- MANDELS, M.; REESE, E.T. Induction of celulase in fungi by cellobiose. **Journal Bacteriology**, v.79, p. 816-826, 1960.
- MILLER, G. H. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Annals of Chemistry**. Washington v. 31, p. 426-429, 1959.
- MUNIR, M.D.; KHAN, H. ALI, S.; FAKHU'B-RAZI, A.; ALAM, M.D.Z. Use of fungi for the bioconversion of rice straw into cellulose enzymes. **Jornal of Enviromental Science ad Health Part B**. v. 42, NOGUEIRA, E.B.S.; CAVALCANTI, M.A.Q. Cellulolytic fungi isolated from processed oats. **Revista de Microbiologia**, v. 27, p. 7-9, 1996.
- OGEDA, T.L.; PETRI, D.F.S. Revisão: Hidrólise enzimática de biomassa. **Química Nova**. v. 33, p. 1549-1558, 2010.
- OLOFSSON, K. BERTILSSON, M. A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. **Biohecnol Biofuels**. v. 1, n.7, p. 1-14, 2008.
- RODRIGUEZ-ZUÑINGA, V. F.; FARINEA, C.S; NETO, V.B.; COURI, S.; CRESTANA, S. Produção de celulases por *Aspergillus niger* por fermentação em estado sólido. **Pesquisa Agropecuária**. v. 46, n. 8, p. 912-919, 2012.
- RUEGGER, M.J.S.; TAUKE-TORNISIELO, S.M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins. São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, n. 27, v. 2, p. 205-211, 2004.
- SANTOS, F.A.; QUEIROZ, J.H.; COLEDETTE, J.L.; FERNANDES, S. A.; GUIMARÃES, V.M.; RESENDE, S. T. Potencial da palha de cana-de-açúcar para produção de etanol. **Química Nova**.v.35, p. 1004-1010, 2012.
- SCHEUFELE, F. B.; BUTZKE, A. S.; MARRA, I. F.; HASAN, S.D.M.; FIORESE, M.L. Otimização dos parâmetros de hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. **Engevista**, v. 14, n. 3, p. 310-321, 2012.
- THEATER, R. M.; WOOD, P. J. Use of congo red- Polysaccharide interations in enumeration and characterizaton of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 777-780, 1982.
- WILLIAMS, M. A. J. **International Mycological Institute**, Department of Microbiology, University of Leicester, PO Box 138, Medical Sciences Building, University Road, 1983.