

---

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

---

**VITOR HUGO MALLAGUTTI**

**PRODUÇÃO DE CELULASES POR  
FUNGOS FILAMENTOSOS DA  
ANTÁRTICA: BUSCA POR NOVO  
RECURSO GENÉTICO PARA  
OBTENÇÃO DE BIOETANOL**



**VITOR HUGO MALLAGUTTI**

**PRODUÇÃO DE CELULASES POR FUNGOS FILAMENTOSOS  
DA ANTÁRTICA: BUSCA POR NOVO RECURSO GENÉTICO  
PARA OBTENÇÃO DE BIOETANOL**

**Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lara Durães Sette**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

**Rio Claro**

**2015**

547.758 Mallagutti, Vitor Hugo  
M252p      Produção de celulases por fungos filamentosos da  
Antártica : busca por novo recurso genético para obtenção de  
bioetanol / Vitor Hugo Mallagutti. - Rio Claro, 2015  
42 f. : il., figs., gráfs., tabs., quadros

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências  
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de  
Bociências de Rio Claro

Orientador: Lara Durães Sette

1. Enzimas. 2. Biocombustível. 3. Microorganismo. 4.  
Planejamento experimental. I. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar agradeço a minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lara Durães Sette, pela oportunidade, pelos conhecimentos transmitidos, pelo suporte no pouco tempo que lhe coube, pelas suas correções e incentivos.

Ao Programa de Formação de Recursos Humanos em Geociências e Ciências Ambientais Aplicadas ao Petróleo – PRH 05/UNESP, ao PFRH/Petrobrás e ao PRH/ANP – FINEP/MCT, pelo apoio acadêmico e financeiro, indispensáveis à realização deste trabalho de conclusão de curso.

Aos meus pais, pelo amor, incentivo e apoio incondicional, proporcionando-me as melhores condições de ensino.

Aos meus queridos amigos, companheiros e irmãos da turma de 2011 do curso de Ciências Biológicas pela Unesp de Rio Claro/SP, pelas alegrias, tristezas e dores compartilhadas. Com vocês, as pausas entre um parágrafo e outro de produção, com toda certeza nem vocês lembram da quantidade de pausas que ocorreram neste período, me ajudou em tudo o que tenho produzido na vida. Muito obrigado por me acolherem como amigo. Vocês já fazem parte da minha vida.

Em especial para todos os moradores e agregados da Rep. Porva, Fernando Bonfiglioli (Aveia), Henrique Pinho (Gaga), Luis Roberto Bueno (Habib's) e Marina da Silveira (Inabilidade), por me aguentarem diariamente ao decorrer desses anos, sei que não foi fácil, porém tenho certeza que assim como eu sentirão saudade desta convivência diária.

Aos meus amigos de Valinhos, por conseguir me tirar de casa nos finais de semana para beber uma(s) e esquecer todo o estresse acumulado durante a semana. Tirando os momentos vivenciados nas praias e churrascos, que com toda certeza serão lembrados pro resto da minha vida.

Aos colegas do LAMAI (Laboratório de Micologia Ambiental e Industrial), pelo suporte e auxílio prestado no andamento do meu projeto.

A todos os professores do curso, que foram tão importantes na minha vida acadêmica e no desenvolvimento desta monografia.

Obrigado a todas as pessoas que contribuíram para meu sucesso e para meu crescimento como pessoa direto e indiretamente. Sou o resultado da confiança e da força de cada um de vocês.

## RESUMO

Na busca de novos recursos genéticos capazes de produzir enzimas celulolíticas a baixas/médias temperaturas, o continente Antártico vem demonstrando ser um ambiente bastante promissor. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência de diferentes fatores na produção de celulases por fungos filamentosos isolados de amostras da Antártica visando otimização do processo possível aplicação das mesmas na produção de etanol de segunda geração. Foram utilizados os fungos L1-1 e E5B da Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP) os quais foram previamente selecionados devido ao potencial celulolítico. O delineamento experimental foi utilizado para analisar a influência de variáveis independentes na produção enzimática. A quantificação da celulase foi realizada pelo método do ácido dinitrosalicílico (ADNS). Antes de iniciar à aplicação dos planejamentos experimentais, foram adotadas estratégias para tentar minimizar e otimizar ao máximo o potencial dos isolados, as quais resultaram no estabelecimento da melhor agitação e a temperatura para a produção de celulase em 150 rpm e 20°C, para os dois isolados estudados. Inicialmente os fungos E5B e L1-1 apresentavam suas produções enzimáticas em 0,233U/mL e 0,342U/mL, respectivamente (antes da aplicação dos desenhos experimentais). Durante a condução do planejamento experimental do tipo Plackett&Burman(PB), foi verificada a preferência dos isolados pela fonte de carbono glicose, com efeito significativo na produção de celulases para os dois isolados. Tendo em vista o seu elevado custo comercial, foram realizados estudos com a sacarose, uma fonte de carbono alternativa e mais barata, bem como indutores enzimáticos. Após três planejamentos experimentais do tipo PB, foi selecionado o isolado L1-1 como o melhor produtor da enzima celulase. Após a condução de um quarto planejamento experimental do tipo Fatorial Fracionado  $2^{4-1}$ , as composição do meio de cultivo do ensaio 3 (1,888 U/mL) foi considerada como a melhor condição para a produção da enzima levando-se em consideração a ausência da glicose no meio de cultivo. O experimento de validação confirmou a produção da enzima nas condições consideradas otimizadas, com um aumento de 5,27 vezes na produção em

comparação com o resultado inicial, antes da aplicação do planejamento experimental.

**Palavras-chave:** Biocombustível, Microorganismo, Enzimas adaptadas ao frio, Planejamento Experimental.

# SUMÁRIO

	Pág.
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1. Material lignocelulósico</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1.1. Celulose</b> .....	<b>7</b>
<b>1.2. Etanol celulósico e a importância do biocombustível</b> .....	<b>8</b>
<b>1.3. Celulase</b> .....	<b>10</b>
<b>1.3.1. As enzimas do complexo celulolítico</b> .....	<b>12</b>
<b>1.3.2. Enzimas adaptadas ao frio</b> .....	<b>13</b>
<b>1.3.3. Outras aplicações da enzima celulase</b> .....	<b>14</b>
<b>1.4. Planejamento experimental: uma ferramenta estatística</b> .....	<b>15</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>16</b>
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	<b>16</b>
<b>3.1. Micro-organismos</b> .....	<b>16</b>
<b>3.2. Preparo do inóculo</b> .....	<b>17</b>
<b>3.3. Determinação da atividade de celulase</b> .....	<b>17</b>
<b>3.4. Curva padrão de Glicose</b> .....	<b>18</b>
<b>3.5. Avaliação da influência de diferentes fatores na produção de celulase e liberação de açúcares fermentescíveis visando otimização do processo</b> --	<b>18</b>
<b>3.6. Análise dos dados</b> .....	<b>18</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	<b>33</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>35</b>
<b>7. ANEXOS</b> .....	<b>39</b>
<b>7.1. Anexo 1- Matriz Codificada Plackett &amp; Burman – 16 ensaios</b> .....	<b>39</b>
<b>7.2. Anexo 2 - Matriz Codificada Plackett &amp; Burman – 16 ensaios</b> .....	<b>39</b>
<b>7.3. Anexo 3 - Matriz Codificada Plackett &amp; Burman – 16 ensaios</b> .....	<b>40</b>
<b>7.4. Anexo 4 - Matriz Codificada Plackett &amp; Burman – 16 ensaios</b> .....	<b>40</b>
<b>7.5. Anexo 5 - Matriz Codificada Plackett &amp; Burman – 16 ensaios</b> .....	<b>41</b>
<b>7.6. Anexo 6 – Codificação Fatorial Fracionado <math>2^{4-1}</math></b> .....	<b>41</b>



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Material lignocelulósico

O material lignocelulósico é a biomassa mais abundante do planeta, possuindo um baixo custo comercial e um elevado potencial para produção em larga escala de combustíveis e produtos químicos (WYMAN, 1994). Este material compreende os resíduos agroindustriais, como por exemplo o bagaço de cana-de-açúcar, sabugo de milho, palha de trigo, entre outros) (PANDEY et al., 2000).

Os materiais lignocelulósicos são geralmente denominados de resíduo agroindustrial por conta de não possuírem valor de mercado, sendo utilizados geralmente como fonte de alimento animal ou para a queima. A sua composição básica é constituída de celulose, hemicelulose e lignina, em proporções que variam entre 33%~55%, 21%~40% e 7%~30%, respectivamente, de acordo com o material vegetal analisado (tabela 1).

**Tabela 1.** Composição de diferentes resíduos lignocelulósicos

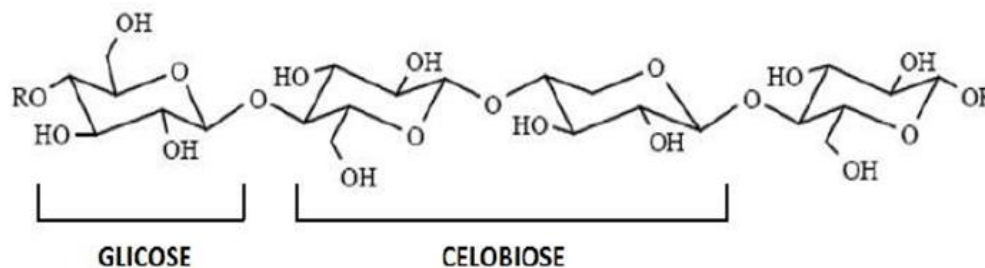
Fonte	Composição (%)			
	Celulose	Hemicelulose	Lignina	Outros
Bagaço de cana <sup>1</sup>	36	28	20	6-11
Palha de cana <sup>2</sup>	36	21	16	27
Sabugo de milho <sup>1</sup>	36	28	16	4-10
Palha de arroz <sup>3</sup>	33	26	7	20
Jornal impresso <sup>2</sup>	40-55	25-40	18-30	-
Madeira (pinheiro) <sup>1</sup>	44	26	29	-

FONTE: OLSSON & HAHN-HÄGERDAL (1996); SHLESER (1994); AWAFO (1997)

#### 1.1.1. Celulose

O componente mais encontrado na estrutura da parede celular das plantas é a celulose, sendo assim consequentemente é o polímero mais abundante na Terra, que é composto por centenas de moléculas de glicose ligadas por pontes  $\beta(1,4)$ -glicosídicas. A unidade básica que se repete é o dissacarídeo celobiose (Figura 1). As cadeias de celulose possuem organização fibrilar, com ligação de hidrogênio intermoleculares e intramoleculares (LEHNINGER, 1985).

**Figura 1.** Estrutura de um fragmento de celulose (Fonte: FENGEL e WEGENER, 1989).



A celulose é a fonte de energia que mais se acumula no planeta, em forma de tecidos mortos ou como resíduos agroindustriais. A biodegradação é o processo mais importante de decomposição desses detritos vegetais. Tendo conhecimento sobre essas atividades, é possível utilizar esse potencial em benefício da tecnologia, para além de produzir enzimas, utilizar os produtos dessa reação (HARGREAVEZ, 2008).

Este polímero composto por várias moléculas de glicose pode ser hidrolisado enzimaticamente pela ação de micro-organismos gerando assim açúcares fermentescíveis, no qual podem ser utilizados futuramente na produção de etanol celulósico (DELABONA, *et al*, 2009).

## 1.2. Etanol celulósico e a importância do biocombustível

O etanol celulósico (ou bioetanol) é produzido a partir da utilização de um matéria-prima denominada de biomassa lignocelulósica e os estudos deste processo vem crescendo na área de produção de energia renovável. A utilização dessa matéria-prima, obtida a partir de resíduos agroindustriais, ocasiona um aumento da produção de etanol, uma vez que a produção a partir da fermentação de moléculas de açúcar, encontradas em vegetais como cana-de açúcar já está quase limitada pela disponibilidade de área plantada, por competir com a produção de alimentos ou devido aos preços relativos (BNDS; CGEE, 2008).

Atualmente, a conversão pela rota sucroquímica de material lignocelulósico, presente na palha e no bagaço da cana-de-açúcar, em açúcares fermentáveis para a produção de etanol, denominado de etanol de

2ª geração, vem sendo considerada no Brasil como uma alternativa promissora para atender à demanda mundial (SANTOS, *et al*, 2011).

Neste contexto, surge o conceito de biorrefinaria, onde as indústrias químicas usam materiais lignocelulósicos (biomassas renováveis) com a finalidade de produzir combustíveis, produtos químicos e energia, reduzindo a quantidade de dejetos e emissões de poluente no final do processo. A biorrefinaria apresenta-se de forma similar à rota gerada pelas refinarias de petróleo atual, onde há a produção de diversos combustíveis e produtos derivados do petróleo, funcionando como um polo gerador de matéria prima para as demais indústrias (PEREIRA JR., 2008).

A preocupação com o ambiente vem aumentando no decorrer dos anos, principalmente quando o assunto está relacionado ao esgotamento das fontes de combustíveis fósseis, apresentando interesse econômico e social. Além das questões ambientais, um fator que vem estimulando um maior investimento deste mercado é dado pelo crescente aumento na quantidade mundial de energia consumida, estando diretamente relacionado com os parâmetros populacionais atuais e aos parques industriais, alavancando assim a busca em tornar mais acessíveis e eficientes os modos de produção de biocombustíveis. A formação do etanol de segunda geração a partir de matéria prima renovável e abundante, como o bagaço de cana-de-açúcar, pode apresentar-se como fonte de energia com alto potencial alternativo, sendo considerada viável e promissora no Brasil.

O setor dos biocombustíveis vem sofrendo investimento significativo no contexto mundial atual, por conta de gerar soluções capazes de minimizar o aquecimento global por meio da redução de emissão de gases causadores do efeito estufa, um dos maiores problemas gerados pela queima de combustíveis fósseis. Além disso, os biocombustíveis poderiam constituir uma alternativa para o mercado do petróleo, o qual futuramente poderá sofrer consideráveis restrições. Porém, os biocombustíveis apresentam limitações na sua produção, por ser originado a partir de vegetais que necessitam de vasta área territorial para o seu plantio, pode gerar conflito entre a indústria alimentícia e o setor energético (ROSA & GARCIA, 2009).

Em 2020 a demanda por etanol deverá sofrer um crescimento de 45% no Brasil. O etanol de segunda geração vem sendo analisado pelo mercado global como alternativa imprescindível para conseguir suprir essa demanda exorbitante de energia, já que este novo processo para a obtenção do etanol é realizado a partir da hidrólise da lignocelulose, utilizando como base a biomassa gerada no processo produtivo. Diferentemente dos Estados Unidos, o Brasil utiliza como matéria prima a cana-de-açúcar e já se sabe que uma parte do potencial energético é subaproveitada, pois permanece nos campos na forma de palha e bagaço. O etanol de segunda geração visa a utilização dessa matéria prima não utilizada para uma otimização industrial na obtenção de um etanol com as mesmas características físico-químicas e comerciais do seu antecessor (SOUZA, 2013).

Assim, o uso da biotecnologia para converter celulose em etanol fornece oportunidades para as empresas na área de desenvolvimento de enzimas, principalmente celulasas e hemicelulasas (GOLDBECK *et al.*, 2013).

### **1.3. Celulase**

As celulasas desempenham um importante papel na bioconversão de materiais celulósicos em biocombustíveis. O grande gargalo para uma aplicação mais ampla de celulasas na produção de etanol de segunda geração é o seu custo, especialmente porque grandes quantidades das enzimas são necessárias (DELABONA *et al.*, 2012).

A produção de celulasas em escala industrial começou em meados da década de 80, visando sua aplicação como um aditivo para ração animal, de forma a aumentar a digestibilidade de rações por ruminantes e monogástricos. Em seguida, essas enzimas começaram a ser utilizadas como um insumo para a indústria de alimentos, cujo objetivo era de melhorar propriedades sensoriais de massas. Nesse setor, as celulasas também começaram a atuar no processamento de bebidas, promovendo a clarificação de sucos de frutas e vinhos e a manutenção de uma reologia estável do produto final. Posteriormente, as enzimas celulolíticas começaram a ser utilizadas em larga escala nas seguintes indústrias: têxtil, nos então implementados processos de biopolimento (desfibrilação de tecidos como

algodão, linho, lã e viscose) e bioestonagem (amaciamento e desbotamento do brim); de polpa e papel, para a modificação controlada de propriedades mecânicas da polpa e liberação de tintas da superfície das fibras a ser recicladas; e em lavanderia, de forma a aumentar o brilho, a remoção de sujeiras e a maciez dos tecidos. Na década de 90, as celulases, juntamente com as hemicelulases, representavam mais de 20% do mercado mundial de enzimas (CASTRO & PERREIRA JR., 2010).

A biomassa é atualmente a única fonte de energia renovável disponível que pode produzir biocombustível a preços competitivos e em grandes quantidades para o setor de transportes. Contudo, para converter biomassa de biocombustíveis ou outros produtos químicos a celulose precisa ser hidrolisada, liberando a glicose (açúcar fermentescível).

A hidrólise completa da celulose por celulase resulta na produção final de glicose. Estas, porém, por serem proteínas, possuem grande dificuldade para penetrar na barreira natural do tecido das células vegetais, ligninas e hemiceluloses. Por conta, do difícil acesso destas enzimas às fibras de celulose torna-se muito complexo o seu processo de degradação. Assim, um complexo enzimático deve ser utilizado, incluindo as celulases (ou enzimas celulolíticas) (ROSA & GARCIA, 2009).

Na natureza, existe uma grande variedade de microrganismos que produzem celulases; apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, são capazes de degradar a celulose natural. Em condições laboratoriais, algodão e papel de filtro, dentre outros, são usados como substratos indutores para a produção de exo-glicosidases e para medir a atividade do complexo celulolítico total (ROBSON & CHAMBLISS 1989).

A busca por celulases eficientes e alta produtividade na síntese enzimática microbiana são fatores essenciais para aplicação dessas enzimas na produção de bioetanol. As celulases podem ser produzidas por diversos fungos e bactérias. A seleção de cepas fúngicas possuindo alta capacidade de expressão e uma diversidade de enzimas celulolíticas com elevada atividade específica é essencial, a fim de obter complexos enzimáticos capazes de hidrolisar biomassa vegetal a custo reduzido. Os fungos são os organismos mais estudados, devido à sua capacidade de produzir complexos celulolíticos completos e em grandes quantidades. A

maior parte dos estudos é focada em fungos com alta capacidade de produzir celulases, como *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* e *Humicola*, sendo o gênero *Trichoderma* relatado como o mais eficiente na degradação da celulose (LYND *et al.*,2002).

### 1.3.1. As enzimas do complexo celulolítico

As enzimas do complexo celulolítico são hidrolases que clivam ligações O-glicosídicas, sendo classificadas pela *Enzyme Commission* (EC), onde o valor x varia com a celulase avaliada (HENRISSAT, 1991).

Sua classificação é denominada de acordo com o seu local de atuação no substrato celulósico, sendo dividida em três grandes grupos: endoglucanases (EnG),  $\beta$ -glicosidases (BG) e exoglucanases (ExG) (LYND *et al.*,2002).

As endoglucanases (EnG) são enzimas que tem como principal função iniciar a hidrólise de forma randômica nas regiões internas da estrutura amorfa das fibras celulósicas, liberando oligossacarídeos de diversos graus de polimerização. As endoglucanases são responsáveis pela rápida solubilização do polímero celulósico, devido à sua fragmentação em oligossacarídeos (KLEMAN-LEYER, *et. al.* 1996).

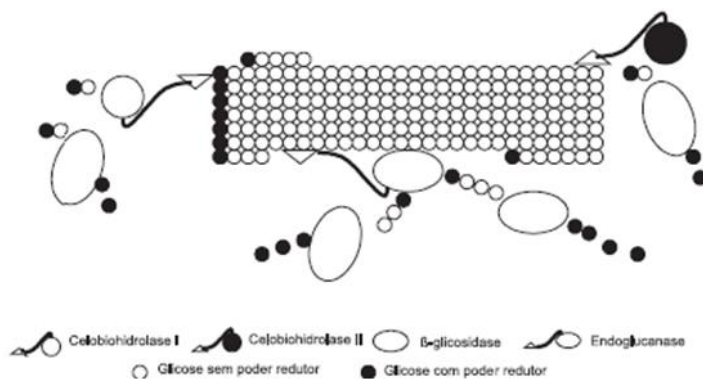
As exoglucanases (ExG) são constituídas por celobiohidrolase (CBH) e glucano-hidrolase (GH). A GH possui estratégia de hidrólise da fibra celulósica de elevada importância, pois é capaz de liberar glicose diretamente do polímero. Já a CBH é uma catalisadora da hidrólise apenas dos terminais não-redutores das fibras, participando assim da hidrólise primária e é responsável pela amorfogênese, um fenômeno ainda não elucidado completamente, porém já se sabe que envolve a ruptura física do substrato desestratificando assim as fibras e consequentemente aumentando a área intersticial (Zhang & LYND, 2004).

As  $\beta$ -glicosidases (BG) têm como propriedade hidrolisar celobiose e oligossacarídeos solúveis em glicose (LYND *et al.*,2002).

Quando ocorre a atuação conjuntamente dos três grupos de enzimas acima citados o seu rendimento é melhor quando comparado à atuação das mesmas de forma isolada. Este efeito é conhecido como sinergia. A figura 2

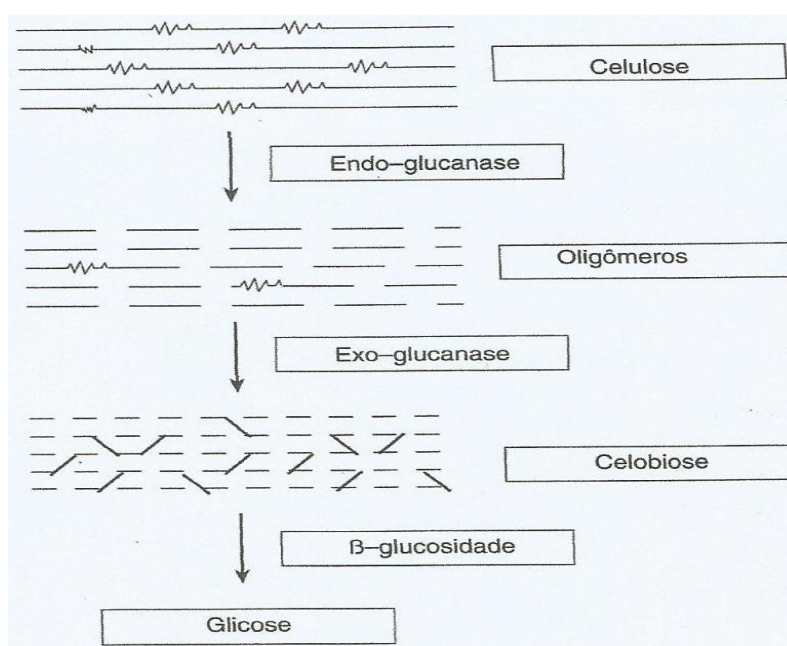
ilustra a ação sinérgica entre exoglucanases, endoglucanase e  $\beta$ -glicosidase na hidrólise da fibra celulósica (CASTRO, A. & PEREIRA JR, N., 2010).

**Figura 2.** Modo de ação das enzimas do completo celulolítico (Fonte: CASTRO e PEREIRA JR, 2010).



Portanto, as endo-glucanases rompem a molécula de celulose ao acaso liberando fragmentos menores, que servem de substrato para as exo-glucanases, que por sua vez têm a função de hidrolisar a molécula pelas pontas e as  $\beta$ -glicosidases hidrolisam a celobiose até glicose (Figura 3) (LIMA, 2001).

**Figura 3.** Modelo de ação das celulasas sobre cadeias de celulose (Fonte: LIMA, 2001).



### **1.3.2. Enzimas adaptadas ao frio**

As enzimas psicrófilas possuem alta atividade específica em temperaturas baixas e moderadas, propriedade extremamente útil em diversos setores da indústria biotecnológica (SIDDIQUI & CAVICCHIOLI, 2006). Mais recentemente, o estudo destas enzimas tem sido estimulado visando diminuição do consumo de energia elétrica no setor industrial (GERDAY et al., 2000). Uma importante característica das enzimas psicrófilas é a correlação da alta atividade catalítica e a estabilidade térmica a temperaturas baixas, que pode ser parcialmente explicado pelo aumento da flexibilidade da molécula, em comparação com enzimas mesófilas e termófilas (GEORLETTE *et al.*, 2004; SIDDIQUI & CAVICCHIOLI, 2006).

O ambiente Antártico é considerado como um dos ambientes mais extremos da Terra por apresentar condições extremas de clima, temperatura, escassez de nutrientes, salinidade, dessecação, alto índice de radiação ultra-violeta alternada com longos períodos de ausência de iluminação, induzem mecanismos de adaptação que modulam as comunidades bióticas presentes neste ambiente. Desta forma, os microorganismos da Antártica podem ser considerados estratégicos para estudos envolvendo a biodiversidade e o conhecimento de possíveis mecanismos evolutivos e adaptativos (SOUZA, *et al.* 2011).

Na busca de novos recursos genéticos capazes de produzir enzimas celulolíticas a baixas/médias temperaturas dois fungos filamentosos isolados de amostras de líquen (L1-1) e de estrela do mar (E5B) coletadas na península Antártica, serão estudados.

### **1.3.3. Outras aplicações da enzima celulase**

As enzimas celulolíticas possuem grande importância econômica e diferentes aplicações industriais, sendo um dos mais importantes o setor sucroalcooleiro e papelero, visando aplicação destas enzimas para a obtenção de etanol de segunda geração a partir da celulose dos resíduos da cana-de-açúcar. O interesse prático do uso das celulases está relacionado com a sua capacidade sacarificante. Para tornar viável a produção de etanol de segunda geração é imprescindível viabilizar a produção de enzimas celulolíticas. Essas enzimas também são utilizadas na indústria têxtil para



remover o excesso de cor, para lavagem de jeans e para o amaciamento das fibras por meio da degradação das fibras da superfície, e também para produzir a aparência “*stonewashed*” nos jeans. No setor de processamento de alimentos as celulases são aplicadas na clarificação de sucos e frutas, podendo também auxiliar na extração do suco e do óleo de frutas e sementes das polpas (BÉGUIM & AUBERT, 1994).

Na indústria alimentícia, as celulases são usadas em vários processos, principalmente, na extração de componentes do chá verde, de proteína de soja, de óleos essenciais, de aromatizantes e do amido da batata doce. Essas enzimas participam, ainda, dos processos de produção do vinagre de laranja (ORBERG, 1995).

Outra importante área é o tratamento de resíduos de celulose municipais ou agrícolas. A biomassa destes resíduos acumula-se em grandes quantidades a cada ano, resultando na deterioração do ambiente e uma perda de recursos potencialmente valiosos. A bioconverção destes resíduos poderia ser uma solução prática para este problema. Apesar das inúmeras aplicações, parece que a maior utilização destas enzimas é para conversão à glucose e posterior fermentação na produção de solventes e combustíveis (HOWARD *et al.*, 2003).

#### **1.4. Planejamento experimental: uma ferramenta estatística**

Nos dias atuais, em decorrência das necessidades da sociedade moderna, a pesquisa científica tem promovido grandes avanços em todos os campos da ciência, gerando uma gama crescente de dados e informações, sendo que para a devida exploração e o correto entendimento a aplicação de ferramentas estatísticas torna-se indispensável (PEREIRA-FILHO *et al.*, 2002).

Considerando o fato de que os recursos financeiros e laboratoriais no Brasil encontram-se escassos em decorrência das restrições de verbas para a aquisição de equipamentos e materiais de consumo, uma reflexão deve ser realizada no início de cada pesquisa científica, para a definição das condições experimentais, que permitam a aquisição de resultados confiáveis, já que a otimização de parâmetros experimentais de relevância é considerada como uma das etapas mais críticas do trabalho científico,

principalmente daqueles que têm por objetivo o desenvolvimento de processos tecnológicos aplicáveis em grande escala (PERALTA-ZAMORA et al., 2005).

Geralmente, a otimização de variáveis experimentais é realizada por meio de procedimentos que avaliam o efeito de uma variável por vez (univariado), apresentando desvantagens tais como o tempo gasto para otimização e a falta de avaliação acerca das interações entre as variáveis que afetam o processo em estudo. De acordo com BRASIL et al. (2007), estas desvantagens resultam numa otimização ineficiente, impedindo o rápido estabelecimento de ótimos verdadeiros, os quais são atingidos pelo emprego de sistemas multivariados.

Dentre os diversos tipos de planejamento experimental, os sistemas de planejamento fatorial se destacam, pois permitem avaliar simultaneamente o efeito de um grande número de variáveis, a partir de um número reduzido de ensaios experimentais, quando comparados aos processos univariados (PERALTA-ZAMORA et al., 2005).

## **2. OBJETIVOS**

O presente projeto está associado ao Projeto Fapesp 2013/19486-0 e tem como objetivo principal avaliar a influência de diferentes fatores na produção de celulases pelos fungos filamentosos L1-1 e E5B e otimização do processo.

## **3. METODOLOGIA**

### **3.1. Micro-organismos**

Os fungos filamentosos L1 e E5B utilizados no presente projeto foram previamente selecionados dentre 53 fungos celulolíticos da Antártica como os melhores produtores de celulases no âmbito do projeto FAPESP 2010/17033-0 “Exploração biotecnológica de fungos derivados da Antártica”. Os fungos estão sendo mantidos nas coleções de pesquisa associadas à Coleção Brasileira de micro-organismos de Ambiente e Indústria (CBMAI) do CPQBA/UNICAMP e à Central de Recursos Microbianos da UNESP (CRM-UNESP).

### 3.2. Preparo do inóculo

Os isolados E5B e L1-1 foram cultivados em meio PDA (Potato Dextrose Agar) e incubados a 20 °C. Após um período de 7 ± 1 dias, foram inoculados em meio sólido (1,0 g/L de extrato de levedura, 0,5 g/L MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,5 g/L NaNO<sub>3</sub>, 1,0 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,01 g/L FeSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O) contendo 10 g/L de carboximetilcelulose (CMC) e 10 g/L Ágar, por meio de corte, sobre o qual foi colocado um disco de ágar de 5 mm de micélio. Após 7 dias de cultivo discos de ágar + micélio (5 mm de diâmetro) foram utilizados como inóculo nos diferentes meios do planejamento experimental.

### 3.3. Determinação da atividade de celulase

A atividade celulolítica foi determinada usando uma solução de CMC 1.0 % em tampão citrato de sódio 50 mM pH 4.8 como substrato, por meio da estimativa da liberação de açúcares utilizando o método do ácido dinitrosalicílico (ADNS) (Chose, 1987; Miller, 1959). As leituras de absorbância foram realizadas a 540 nm em espectrofotômetro Biochrom (Libra S6). Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de glicose por minuto por mL, de acordo com a curva padrão de glicose.

Foi utilizada a seguinte formula para a conversão de valores:

$$U = \frac{1}{\epsilon} * \frac{V_r}{V_e} * \frac{1}{T} * 1000 * Abs * Diluição$$

Onde:

**U** = Unidade de atividade.

**ε** = Obtido na curva de açúcar:

$$\epsilon = a * Massa\ molar\ da\ xilose$$

**a** = a da reta da curva padrão de xilose

**V<sub>r</sub>** = Volume da reação (tampão + caldo enzimático), em μL.

**V<sub>e</sub>** = Volume pipetado do caldo enzimático, em μL.

**T** = tempo da reação enzimática, em minutos.

**Abs** = Média da absorbância das réplicas.

### **3.4. Curva padrão de Glicose**

Para a determinação da curva padrão de glicose foi utilizada uma solução padrão de glicose 0,005M (1,47g de xilose em 100 mL de água destilada). A partir desta solução foram feitas 9 diluições. Para obtenção da diluição 0 (mais concentrada) pipetou-se 100  $\mu$ L da solução padrão, a partir daí foram pipetados 10  $\mu$ L a menos da solução padrão para cada diluição (90  $\mu$ L, 80  $\mu$ L, 70  $\mu$ L, 60  $\mu$ L, 50  $\mu$ L, 40  $\mu$ L, 30  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 10  $\mu$ L) e completou-se com água destilada para 100  $\mu$ L.

A quantificação das diluições se deu por meio da estimativa da liberação de açúcares utilizando o método do ácido dinitrosalicílico (ADNS) (Miller, 1959) e então foi elaborada um gráfico relacionando absorvância e concentração de açúcar (mg/mL), na qual foi obtido a linha de tendência e a equação da reta.

### **3.5. Avaliação da influência de diferentes fatores na produção de celulase e liberação de açúcares fermentescíveis visando otimização do processo.**

Os fungos filamentosos selecionados foram submetidos à avaliação de diferentes fatores na produção enzimática por meio do delineamento experimental. No estudo estatístico foram utilizadas as seguintes variáveis independentes: fontes de C e N, alterações no pH, indutores, quantidade de inoculo, conforme matriz do planejamento montada utilizando o software STATISTICA 7.0 (STAT SOFT, INC. 1995). A agitação e temperatura foram previamente determinados antes do planejamento experimental e fixados para a condução do mesmo.

### **3.6. Análise dos dados**

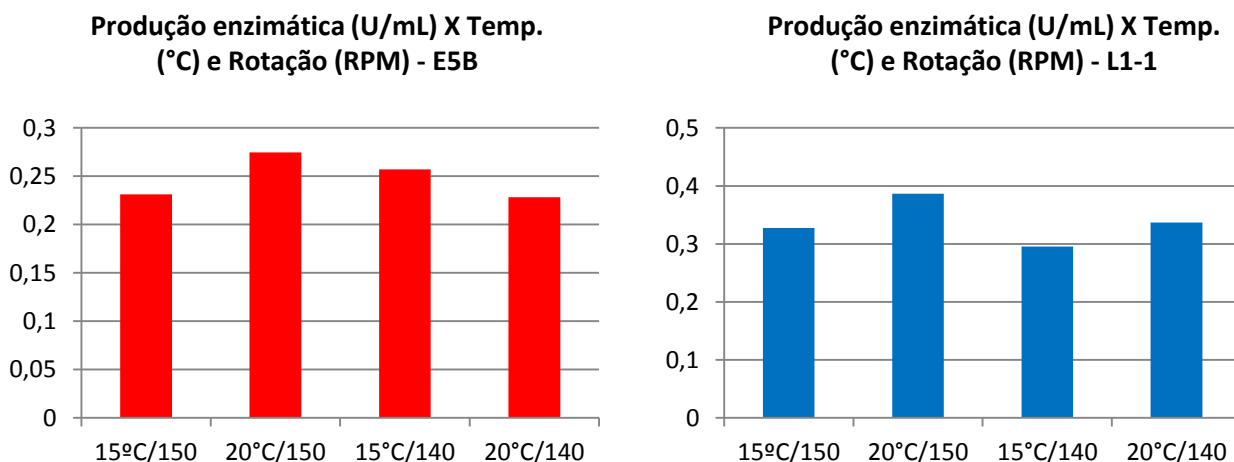
Os dados obtidos a partir dos desenhos experimentais do tipo PB e fatorial foram analisados estatisticamente utilizando o programa STATISTICA 7.0 (STAT SOFT, INC. 1995).

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os fungos filamentosos E5B e L1-1, isolados de amostras de estrela do mar e líquen da Antártica, respectivamente, foram submetidos à avaliação de diferentes fatores com o intuito de otimizar as suas produções enzimáticas. Em estudos anteriores, os fungos apresentaram sem nenhum tipo de indução valores de 0,233 U/mL e 0,342 U/mL de celulase, respectivamente.

Previamente à aplicação do planejamento experimental, a produção enzimática foi avaliada em diferentes níveis de agitação e temperatura para os dois fungos estudados. Os resultados demonstraram que a temperatura de 20°C e agitação de 150 rpm foram as melhores condições para o isolado L1 e E5B (Figura 4), os quais apresentaram produção de celulase de 0,274 U/mL (isolado E5B) e 0,387 U/mL (isolado L1-1).

**Figura 4.** Gráficos referente ao primeiro desenho experimental estabelecendo a fixação das variáveis temperatura e rotação (20°C e 150RPM, respectivamente) para ambos os isolados (E5B e L1-1), após 7 dias de crescimento em meio basal de CMC.



A partir da definição das variáveis temperatura e agitação, foram realizadas buscas na literatura visando seleção de variáveis com potencial efeito significativo no processo de produção de celulases. Assim, oito variáveis independentes (quantidade de inóculo, diferentes fontes de

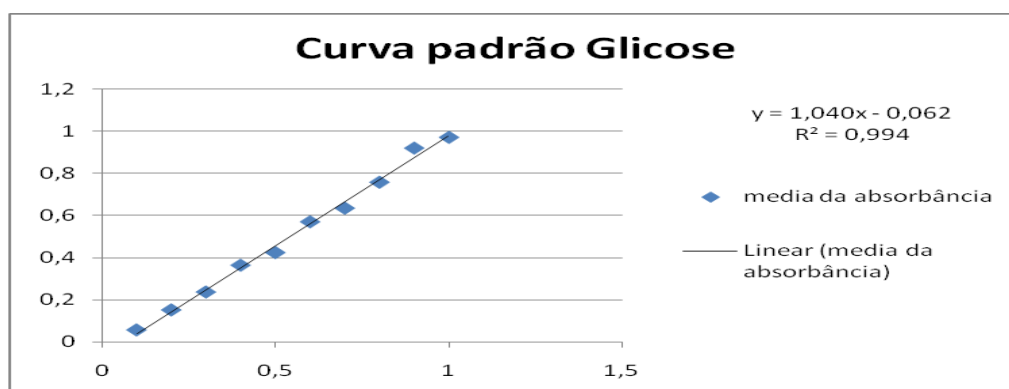
carbono e nitrogênio e pH) foram selecionadas para o desenvolvimento do primeiro desenho experimental, do tipo PB (Plackett&Burman). Para tanto, foi aplicada uma matriz PB de 12 ensaios e 4 pontos centrais, totalizando 16 ensaios. As variáveis e suas respectivas faixas de concentrações estão apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Variáveis aplicadas ao primeiro PB para a produção de celulasas pelos fungos filamentosos da Antártica L1-1 e E5B

Variáveis	-1	0	+1
1.Inoculo	3	4	5
2.CMC	0	1 % (0,5 g/50ml)	2% (1,0 g/50ml)
3.Glicose	0	1% (0,5 g/50ml)	2% (1,0 g/50ml)
4.Extrato Malte	0	1% (0,5 g/50ml)	2% ( 1,0 g/50ml)
5.Peptona	0	0,1% (0,05 g/50 ml)	0,2% (0,10 g/50 ml)
6.Extrato de levedura	0	1 (0,05 g/50ml)	2 (0,10 g/50ml)
7.NH <sub>4</sub> Cl	0	0,1% (0,05 g/50 ml)	0,2% (0,10 g/50 ml)
8.pH	4,5	5,5	6,5

As amostras referentes ao primeiro PB foram centrifugadas e os caldos brutos foram utilizados para a leitura da absorbância. Os resultados das leituras estão apresentados na Tabela 2 e foram utilizados para calcular a quantidade de celulasas obtidas para cada um dos fungos estudados, utilizando a curva padrão de glicose apresentada na Figura 5.

**Figura 5.** Curva padrão de Glicose. Concentração de Glicose (uMol/100uL) X Média da Absorbância.



A partir da equação (regressão linear) obtida na curva padrão de glicose foi possível determinar a quantidade de glicose liberada e converter para a quantidade de celulases presente em casa ensaio (Tabela 3 e Tabela 4).

**Tabela 3.** Resultados de atividade de celulase obtidos no primeiro PB após 7 dias de cultivo a 20°C e 150 rpm para o isolado L1-1.

Ensaio	U/mL/min	Ensaio	U/mL/min
1	0,7888	9	0,35948
2	0,35627	10	0,24414
3	0,59176	11	0,36909
4	0,65103	12	0,20088
5	0,32584	13 (C)	0,38511
6	0,73433	14 (C)	0,39632
7	0,59977	15 (C)	0,36909
8	0,43637	16 (C)	0,36589

**Tabela 4.** Resultados de atividade de celulase obtidos no primeiro PB após 7 dias de cultivo a 20°C e 150 rpm para o isolado E5B.

Ensaio	U/mL/min	Ensaio	U/mL/min
1	0,86890	9	0,29380
2	0,29380	10	0,26176
3	0,97783	11	0,19768
4	0,70710	12	0,16885
5	0,22491	13 (C)	0,26016
6	0,72472	14 (C)	0,28739
7	0,78880	15 (C)	0,27778
8	0,83686	16 (C)	0,29059

Os ensaios 1, 4 e 6 apresentaram melhores resultados de produção de celulases para o isolado L1-1 que foram de 0,789, 0,651 e 0,734 U/mL, respectivamente (Tabela 3). Para o isolado E5B os melhores resultados foram obtidos nos ensaios 1, 3 e 8 com a quantidade de 0,869, 0,978 e 0,837 U/mL, respectivamente (Tabela 4). A composição dos ensaios do primeiro PB (matriz PB) tanto para o isolado L1-1 quanto para o E5B está apresentada no ANEXO1)

Com auxílio do programa STATISTIC 7.0 foi possível analisar quais variáveis apresentaram efeito significativo, efeito positivo e efeito negativo (Quadro 1 e Quadro 2).

**Quadro 1.** Análise estatística do efeito das variáveis do primeiro PB (STATISTICA 7.0) para o isolado L1-1 ( $p \geq 0,1$ ).

<b>L1-1</b>	Efeito	Erro Padrão	t(6)	p- Valor
Mean/Interc.	0,448385	0,023755	18,8752	0
(1)Inoculo	0,09051	0,05486	1,64982	0,142966
(2)CMC	0,049393	0,05486	0,90035	0,397851
(3)Glicose	<b>0,324394</b>	<b>0,05486</b>	<b>5,91309</b>	<b>0,000592</b>
(4)Ext. Malte	-0,033374	0,05486	-0,60834	0,562172
(5)Peptona	-0,045656	0,05486	-0,83221	0,43276
(6)Ext. de levedura	0,042986	0,05486	0,78354	0,458993
(7)NH <sub>4</sub> Cl	-0,021626	0,05486	-0,39421	0,705163
(8)pH	0,071821	0,05486	1,30915	0,231817

**Quadro 2.** Análise estatística do efeito das variáveis do primeiro PB (STATISTICA 7.0) para o isolado E5B ( $p \geq 0,1$ ).

<b>E5B</b>	Efeito	Erro Padrão	t(6)	p- Valor
Mean/Interc.	0,478021	0,046428	10,29605	0,000049
(1)Inoculo	-0,030437	0,103815	-0,29318	0,779257
(2)CMC	0,011748	0,103815	0,11316	0,913596
(3)Glicose	<b>0,577235</b>	<b>0,103815</b>	<b>5,56021</b>	<b>0,001432</b>
(4)Ext. Malte	-0,009078	0,103815	-0,08744	0,933166
(5)Peptona	0,049126	0,103815	0,47321	0,652789
(6)Ext. de levedura	-0,066214	0,103815	-0,6378	0,547155
(7)NH <sub>4</sub> Cl	0,002136	0,103815	0,02057	0,984252
(8)pH	0,014418	0,103815	0,13888	0,894092

Os dados estatísticos serviram de base para o delineamento do próximo planejamento experimental (segundo PB). A glicose apresentou efeito significativo positivo para os dois isolados e foi mantida no segundo PB, sendo sua concentração aumentada (Tabela 5 e Tabela 6). Tendo em vista os melhores resultados de atividade enzimática terem sido obtidos em pH 6,5 para o isolado L1-1, o mesmo foi fixado neste valor para o próximo experimento. A variável peptona foi excluída, por apresentar efeito negativo e as variáveis com efeito positivo (mesmo que não significativo) foram mantidas e tiveram os seus valores aumentados (Tabela 5).



As análises estatísticas dos experimentos do primeiro PB para o isolado E5B resultaram em duas variáveis com efeito negativo: extrato de malte e extrato de levedura (-0,0091 e -0,066 respectivamente), as quais foram excluídas no segundo PB. Para este isolado, assim como para o isolado L1-1, as variáveis com efeito positivo (mesmo que não significativo) foram mantidas e tiveram os seus valores aumentados (Tabela 6). O pH foi novamente incluído como variável independente, visto que os melhores resultados obtidos de produção de celulase pelo isolado E5B foram em diferentes pH.

**Tabela 5:** Variáveis aplicadas ao segundo PB para a produção de celulase pelo isolado L1-1

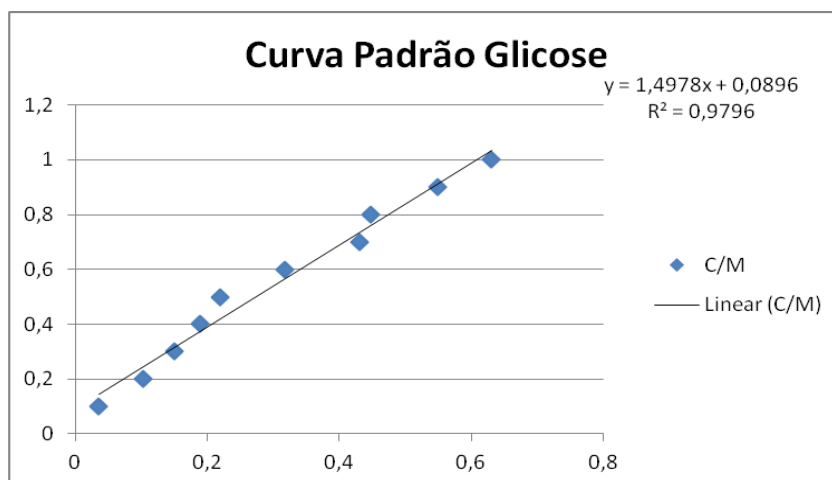
Variáveis	-1	0	1
1.Inóculo	4	5	6
2.CMC	0	2 % (1,0 g/50ml)	3% (1,5 g/50ml)
3.Glicose	0	2% (1,0 g/50ml)	3% (1,5 g/50ml)
4.Ext Malte	0	2% (1,0 g/50ml)	3% (1,5 g/50ml)
5.Extrato de levedura	0	2 (0,10 g/50ml)	3 (0,15 g/50ml)
6.NH <sub>4</sub> Cl	0	0,1% (0,05 g/50 ml)	0,2% (0,10 g/50 ml)

**Tabela 6:** Variáveis aplicadas ao segundo PB para a produção de celulase pelo isolado E5B

Variáveis	-1	0	1
1.Inóculo	3	4	5
2.CMC	0	2 % (1,0 g/50ml)	3% (1,5 g/50ml)
3.Glicose	0	2 % (1,0 g/50ml)	3% (1,5 g/50ml)
4.Peptona	0	0,2% (0,10 g/50 ml)	0,3% (0,15 g/50 ml)
5.NH <sub>4</sub> Cl	0	0,2% (0,10 g/50 ml)	0,3% (0,15 g/50 ml)
6.pH	4,5	5,5	6,5

Ao final do segundo PB as amostras foram centrifugadas e os caldos brutos (sobrenadante) foram utilizados para a leitura da absorbância. Para calcular a quantidade de enzima para cada um dos fungos estudados foi utilizada a equação (regressão linear) obtida na curva padrão de glicose apresentada na Figura 6. As quantidades de celulsases presentes em casa ensaio estão apresentadas nas Tabelas 7 e 8.

**Figura 6:** Curva padrão de Glicose. Concentração de Glicose (uMol/100uL) X Média da Absorbância.



**Tabela 7.** Resultados da atividade de celulase obtidos no segundo PB após 7 dias de cultivo a 20°C e 150 rpm para o isolado L1-1.

Ensaio	U/mL/min	Ensaio	U/mL/min
1	1,181	9	0,158
2	0,657	10	0,071
3	1,261	11	0,522
4		12	0,112
5	0,473	13 (C)	0,177
6	0,169	14 (C)	0,404
7	0,358	15 (C)	0,417
8	1,274	16 (C)	0,411

**Tabela 8.** Resultados da atividade de celulase obtidos no segundo PB após 7 dias de cultivo a 20°C e 150 rpm para o isolado E5B.

Ensaio	U/mL/min	Ensaio	U/mL/min
1	1,423	9	0,040
2	0,177	10	0,034
3	0,241	11	0,139
4	0,642	12	0,057
5	0,296	13 (C)	0,222
6	1,179	14 (C)	0,230
7	0,272	15 (C)	0,185
8	0,993	16 (C)	0,166

As maiores quantidade celulases produzida pelo isolado L1-1 foram obtidas nos ensaios 1, 3, 4 e 8 (1,181, 1,261, 1,419, 1,274 U/mL, respectivamente) (Tabela 7). Para o isolado E5B, os melhores resultados

foram obtidos nos ensaios 1, 6 e 8 (1,423, 1,179, 0,993 U/mL, respectivamente) (Tabela 8), comprovando a preferência dos isolados pela glicose como fonte de carbono e energia. A composição dos ensaios do segundo PB (matriz PB) para o isolado L1-1 está apresentada no ANEXO 2 e para o isolado E5B no ANEXO 3.

Com auxílio do programa STATISTIC 7.0 foi possível analisar quais variáveis apresentaram efeito significativo, efeito positivo e efeito negativo (Quadro 3 e Quadro 4).

**Quadro 3:** Análise estatística sobre o efeito das variáveis do segundo PB (STATISTIC 7.0) para o isolado L1-1 ( $p \geq 0,1$ ).

L1-1	Efeito	Erro padrão	t(9)	p- Valor
Mean/Interc.	0,56699	0,09862	5,74903	0,00028
Inóculo	0,04768	0,22776	0,20935	0,83884
CMC	-0,12919	0,22776	-0,56720	0,58445
Glicose	<b>0,61155</b>	<b>0,22776</b>	<b>2,68506</b>	<b>0,02500</b>
Ext Malte	0,17049	0,22776	0,74855	0,47323
Extrato de levedura	-0,14055	0,22776	-0,61710	0,55246
NH4Cl	-0,37675	0,22776	-1,65412	0,13249

**Quadro 4:** Análise estatística sobre o efeito das variáveis do 2º PB (STATISTIC 7.0) para o isolado E5B ( $p \geq 0,1$ ).

E5B	Efeito	Erro padrão	t(9)	p- Valor
Mean/Interc.	0,393950	0,080597	4,887930	0,000862
Inóculo	0,335023	0,186130	1,799944	0,105400
CMC	-0,147621	0,186130	-0,793108	0,448117
Glicose	<b>0,667690</b>	<b>0,186130</b>	<b>3,587229</b>	<b>0,005864</b>
Peptona	-0,108809	0,186130	-0,584589	0,573185
NH4Cl	0,012336	0,186130	0,066278	0,948605
pH	-0,146789	0,186130	-0,788638	0,450597

Após a análise com o programa STATISTIC 7.0 ficou evidente que o aumento da variável glicose implica diretamente na produção de celulases, sendo a presença de CMC não significativa e com efeito negativo. A partir destes resultados foi realizada uma busca na literatura para encontrar novos indutores da produção da enzima para incrementar o meio de cultura basal e tentar fazer os isolados demonstrarem preferência ao CMC. Alguns reagentes como  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{ZnSO}_4$  e  $\text{MnCl}_2$  foram reportados em diversos

trabalhos afim de maximizar a produção de celulase e conseqüentemente aumentar a degradação do CMC (SHAHRIARINOUR, M, *et al.*, 2011.; HAULY, M.C.O. *et al.*, 1983.; VU, V.H. & KIM, K., 2012.; MACIEL *et al.*, 2008).



Para tentar diminuir a quantidade de glicose utilizada no processo, devido ao alto valor deste substrato no mercado inviabilizando um futuro processo industrial, foram realizados experimentos na tentativa de diminuir a concentração de glicose e/ou substituí-la por uma outra fonte de carbono economicamente mais viável, como a sacarose. Foram realizados 26 ensaios alternando a concentração de glicose e sacarose, além do acréscimo dos três novos reagentes para calcular a sua importância (Tabela 13). Todas as leituras de absorbância foram realizadas a 540 nm em espectrofotômetro Biochrom (Libra S6) em triplicata para dar uma maior credibilidade aos resultados, os quais encontram-se apresentados na Tabela 9.

No final do experimento e após a quantificação da atividade celulolítica (Tabela 9), os resultados serviram de base para dar continuidade ao trabalho.

**Tabela 9:** Produção de celulases utilizando Glicose e Sacarose em diferentes concentrações

Ensaio	Glicose	Sacarose	UI
1	1,5g (3%)	0	1,409
2	1,5g (3%)	0	1,085
3	1,5g (3%)	0	1,212
4	1,5g (3%)	0	1,454
5	1g (2%)	0	0,741
6	1g (2%)	0	0,631
7	1g (2%)	0	0,589
8	1g (2%)	0	0,646
9	0	0,5g (1%)	0,194
10	0	0,5g (1%)	0,161
11	0	1g (2%)	0,266
12	0	1g (2%)	0,234
13	0	1,5g (3%)	0,905
14	0	1,5g (3%)	0,868

15	1g (2%)	1,5g (3%)	0,89
16	1g (2%)	1,5g (3%)	0,805
17	1,5g (3%)	1,5g (3%)	1,002
18	1,5g (3%)	1,5g (3%)	1,052
19	0,5g (1%)	1,5g (3%)	0,832
20	0,5g (1%)	1,5g (3%)	0,556
21	1g (2%)	1g (2%)	0,366
22	1g (2%)	1g (2%)	0,298
23	0,5g (1%)	1g (2%)	0
24	0,5g (1%)	1g (2%)	0
25	0,5g (1%)	0,5g (1%)	0
26	0,5g (1%)	0,5g (1%)	0

<b>LEGENDA:</b>	 <b>L1-1</b>	 <b>E5B</b>
-----------------	---	---

No terceiro planejamento experimental (PB) a variável sacarose foi introduzida e a variável inóculo foi fixada em 5 discos agar + micélio para o isolado E5B, pois foi observado no segundo desenho experimental que os maiores valores obtidos estavam em função desta quantidade de inóculo. As variáveis do terceiro PB e suas respectivas quantidades estão apresentadas nas Tabelas 10 e Tabela 11.

**Tabela 10:** Variáveis aplicadas ao terceiro PB para a produção de celulase pelo isolado L1-1.

Variáveis	-1	0	1
<b>1.Inóculo</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>2.CMC</b>	<b>0</b>	<b>2,5% (1,25g)</b>	<b>3,5% (1,75g)</b>
<b>3.Glicose</b>	<b>0</b>	<b>1% (0,5g)</b>	<b>2% (1g)</b>
<b>4.Ext. Malte</b>	<b>0</b>	<b>2,5% (1,25g)</b>	<b>3,5% (1,75g)</b>
<b>5.Ext. Levedura</b>	<b>0</b>	<b>0,2% (0,1g)</b>	<b>0,3% (0,15g)</b>
<b>6.CaCl2</b>	<b>0</b>	<b>0,2% (0,1g)</b>	<b>0,3% (0,15g)</b>

**Tabela 11:** Variáveis aplicadas ao terceiro PB para a produção de celulase pelo isolado E5B.

Variáveis	-1	0	1
1.CMC	0	2,5% (1,25g)	3,5% (1,175g)
2.Glicose	0	1% (0,5g)	2% (1g)
3.Peptona	0	0,2% (0,1g)	0,3% (0,15g)
4.NH4Cl	0	0,2% (0,1g)	0,3% (0,15g)
5.Sacarose	0	1% (0,5g)	2% (1g)
6.pH	4,50	5,50	6,50

Os resultados das atividades celulolíticas do terceiro PB estão apresentados na Tabela 12 e Tabela 13 e foram calculadas com base na equação (regressão linear) obtida na curva padrão de glicose (Figura 3).

**Tabela 12:** Resultados de atividade de celulase obtidas no terceiro PB após 7 dias de cultivo a 20°C e 150 rpm para o isolado E5B.

Ensaio	U/mL/min	Ensaio	U/mL/min
1	0,61	9	0,51
2	0,882	10	0,565
3	1,27	11	0,775
4	2,135	12	0
5	2,252	13 (C)	1,751
6	0,941	14 (C)	2,156
7	1,352	15 (C)	2,073
8	0,217	16 (C)	2,144

**Tabela 13:** Resultados de atividade de celulase obtidas no terceiro PB após 7 dias de cultivo a 20°C e 150 rpm para o isolado L1-1

Ensaio	U/mL/min	Ensaio	U/mL/min
1	2,114	9	0,928
2	1,95	10	1,009
3	0,513	11	0,234
4	2,499	12	0,626
5	1,084	13 (C)	1,158
6	0,663	14 (C)	1,533
7	2,231	15 (C)	1,65
8	0,63	16 (C)	1,594

A adição de sacarose e as concentrações das fontes de carbono, (CMC e Glicose) resultou em um aumento na produção de celulases. Este aumento pode ter ocorrido devido à maior disponibilidade de fonte de carbono e maior crescimento dos isolados, provocando a fixação dos mesmos no CMC e aumentando a excreção de celulase no meio.

Os maiores valores de celulases para o isolado L1-1 foram nos ensaios 1, 4 e 7 com a quantidade de 2,114, 2,499 e 2,231 U/mL, respectivamente (Tabela 13). Para o isolado E5B, os melhores resultados foram obtidos nos ensaios 4, 5 e pontos centrais com a quantidade de 2,135, 2,252, 2,156, 2,073 e 2,144 U/mL, respectivamente (Tabela 12). A composição dos ensaios do terceiro PB (matriz PB) para o isolado L1-1 está apresentada no ANEXO 4 e para o isolado E5B no ANEXO 5.

Com auxílio do programa STATISTIC 7.0 foi possível analisar quais variáveis apresentaram efeito significativo, efeito positivo e efeito negativo (Quadro 5 e Quadro 6).

**Quadro 5:** Análise estatística do efeito das variáveis do terceiro PB (STATISTIC 7.0) para o isolado E5B ( $p \geq 0,1$ ).

E5B	Effect	p
Mean/Interc.	1,227063	0,000181
CMC	0,543500	0,272786
Glicose	0,572500	0,249734
Peptona	0,256833	0,594401
NH4Cl	0,531167	0,283095
Sacarose	0,000167	0,999722
pH	0,174500	0,716322

**Quadro 6:** Análise estatística do efeito das variáveis do terceiro PB (STATISTIC 7.0) para o isolado L1-1 ( $p \geq 0,1$ ).

L1-1	Effect	p
Mean/Interc.	1,276000	0,000000
CMC	0,692833	0,013192
Glicose	-0,188500	0,424091
Ext. Malte	0,469833	0,066506
Ext. Levedura	0,693833	0,013097
CaCl2	-0,804500	0,005991
Sacarose	0,107833	0,643365

De acordo com os resultados das análises estatísticas (efeitos das variáveis) e de produção de celulases, o isolado L1-1 foi selecionado e submetido a um quarto planejamento experimental. A maior produção de celulases a 20°C (2,499 U/mL) foi obtida para este fungo (ensaio 4 do terceiro PB). Em adição, quatro variáveis foram significativas para a produção da enzima, sendo três delas com efeito positivo (CMC, Extrato de Malte e Extrato de Levedura) e uma com efeito negativo ( $\text{CaCl}_2$ ).

No quarto planejamento experimental (Fatorial Fracionado  $2^{4-1}$ ) as variáveis  $\text{CaCl}_2$  e Glicose foram excluídas por apresentar efeito negativo no terceiro PB (Quadro 6). A exclusão de substratos de alto valor comercial pode resultar na redução do valor final do produto em escala comercial.

As variáveis do quarto planejamento experimental, e suas respectivas quantidades porém por conta de apresentar número reduzido de variáveis foi realizado um planejamento fatorial (Tabela 14)

**Tabela 14:** Variáveis a serem aplicadas no primeiro planejamento fatorial fracionado  $2^{4-1}$  para a produção de celulase pelo isolado L1-1.

Variáveis	-1	0	1
CMC	0	2% (1g)	4% (2g)
Ext. Malte	0	2% (1g)	4% (2g)
Ext. Levedura	0	0,2% (0,1g)	0,4% (0,2g)
Sacarose	0	1,75% (0,75 g)	3% (1,5g)

Os resultados das atividades enzimáticas estão apresentados na Tabela 15 e obtidas com a equação (regressão linear) obtida na curva padrão de glicose (Figura 6).



**Tabela 15:** Resultados de atividade de celulase obtidos no quarto desenho experimental (Fatorial Fracionado  $2^{4-1}$ ) após 7 dias de cultivo a 20°C e 150 rpm para o isolado L1-1.

Ensaio	U/mL/min	Ensaio	U/mL/min
1	0,724	7	0,82
2	1,141	8	1,68
3	1,888	9 (c)	2,182
4	0,903	10 (c)	1,832
5	0,35	11 (c)	1,895
6	0,097		

Os valores do quarto planejamento foram um pouco inferiores aos valores do terceiro PB. Neste planejamento, não houve variável significativa, embora o Extrato de Malte tenha sido a variável mais próxima do valor de  $p \leq 0,1$  (Quadro 7). A composição dos ensaios do quarto desenho experimental do tipom Fatorial Fracionado  $2^{4-1}$  para o isolado L1-1 está apresentada no ANEXO 6.

**Quadro 7:** Análise estatística sobre o efeito das variáveis do primeiro planejamento fatorial (STATISTIC 7.0) para o isolado L1-1.

	Effect	p
Mean/Interc.	1,228364	0,000886
CMC	0,009750	0,984203
Extrato de Malte	0,744750	0,165995
Extrato de Levedura	-0,427250	0,400648
Sacarose	0,628750	0,231561

Levando-se em consideração o tempo para finalização do presente trabalho, as condições de cultivo e as quantidades de celulases obtidas o ensaio 3 do quarto planejamento experimental (Tabela 15) foi selecionado para o experimento de validação: 4% (2g / 50 mL) de Extrato de Malte e 3% (1,5g / 50 mL) de Sacarose e inóculo de 5 discos de 5mm de diâmetro. O experimento de validação foi conduzido em duplicata e a atividade enzimática (celulases) foi acompanhada durante oito dias de cultivo a 20°C e

150 rpm. Os resultados da produção de celulases obtida na validação estão apresentados na Tabela 14.

**Tabela 14.** Média dos resultados obtidos da produção de celulase pelo isolado L1-1 na Validação durante 8 dias de cultivo a 20°C e 150 rpm.

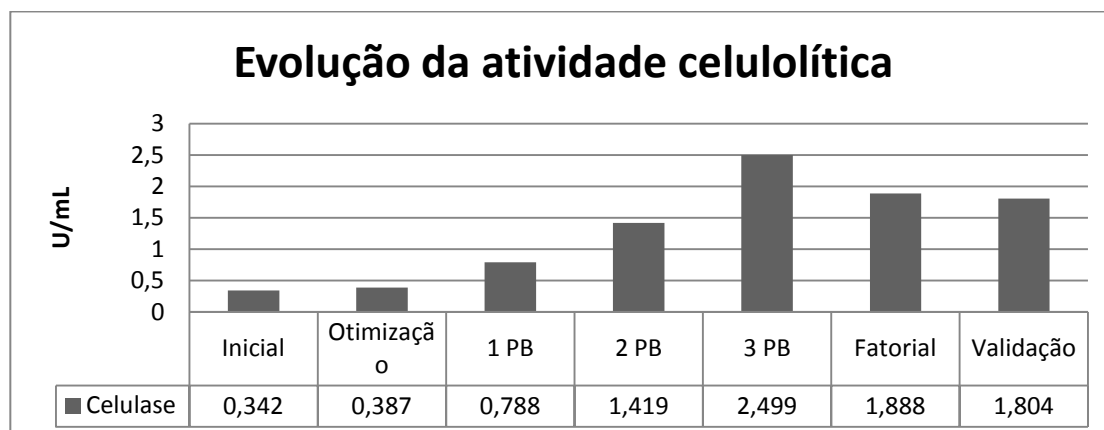
Dia	Ensaio 3 (U/mL)	Dia	Ensaio 3 (U/mL)
1	-	6	1,612
2	0,127	7	1,804
3	0,4345	8	1,791
4	0,873		
5	1,089		

Os resultados obtidos da validação revelaram que a celulase começa a ser produzida no segundo dia de cultivo atingindo o pico de produção no sétimo dia, que foi de 1,804 U/mL, muito próxima à obtida no ensaio 3 do quarto desenho experimental, validando a produção da enzima pelo isolado L1-1 nesta condição de cultivo.

A Figura 7 demonstra a evolução da produção de celulases pelo isolado L1-1 durante o desenvolvimento do trabalho, desde a primeira produção obtida (sem indução), passando pela otimização da temperatura, pH e agitação e pelos planejamentos experimentais (PB), até a condição final de validação da condição otimizada (planejamento Fatorial Fracionado). com o melhor meio, no melhor tempo de produção, realizando a quantificação enzimática no melhor tampão-pH e na melhor temperatura.

Os dados presentes na Figura 7 são dos maiores valores de celulases obtidos em cada uma das etapas do trabalho.

**Figura 7.** Evolução das melhores atividades celulolítica para o isolado L1-1 com temperatura 20°C e rotação de 150 rpm.



Embora a produção de celulases não tenha sido altamente significativa, a Figura 7 demonstra claramente a evolução positiva da produção da enzima após a aplicação do planejamento experimental. O experimento de validação confirmou a condição escolhida como a melhor para produção de celulases pelo isolado L1-1 levando-se em consideração os componentes do meio de cultivo. Em adição, o planejamento permitiu avaliar a influência das variáveis na produção da enzima, e substituir a glicose por uma fonte de carbono e negra mais barata. Estes resultados evidenciam o potencial desta ferramenta na otimização de condições de cultivo para uma possível produção futura em escala industrial.

Os isolados foram identificados por taxonomia molecular (projeto de mestrado de Mariana Barato) como pertencente aos gêneros *Cladosporium* (E5B) e *Geomyces* sp. (L1-1). O gênero *Geomyces* apresenta características psicrófilicas e é halotolerante (POOLE; PRICE, 1971). Espécies pertencentes a esse gênero foram reportadas por Zhdanova et al. (2000) como micro-organismos que conseguem crescer no ambiente Antártico a elevados níveis de contaminação por radiação, maiores que 220 mR h<sup>-1</sup>, medido como nível de radiação gama.

## 5. CONCLUSÕES

Apesar dos problemas enfrentados ao decorrer do projeto relacionados com as adaptações na metodologia de análise e quantificação dos açúcares fermentescíveis. A metodologia redefinida para a determinação da celulase irá servir de base para futuros projetos do nosso grupo de pesquisa.

A aplicação do desenho experimentou resultou em um aumento de 5,27 vezes na atividade enzimática em relação à produção obtida inicialmente, o que demonstra a eficácia na técnica.

Além disto, no ensaio escolhido para realizar a validação ensaio 3 do ultimo planejamento (Fatorial Fracionado), a glicose não estava presente como fonte de carbono em sua composição, indicando o sucesso na tentativa de eliminação desta variável, devido ao fato de seu elevado custo de mercado, o que poderia encarecer o valor do produto final e conseqüentemente impossibilitar a comercialização do mesmo.

Por se tratar de um fungo filamentosos adaptado ao frio, os resultados do presente estudo estimulam a condução de novos estudos relacionados à caracterização físico-química e molecular da enzima, clonagem e expressão heteróloga e de aplicação em baixas temperaturas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AWAFO, V.A.; CHAHAL, D.S.; SIMPSON, B.K. Optimization of ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* (ATC 60868) and *Pichia stipitis* Y-7124: A response surface model for simultaneous hydrolysis and fermentation of wheat straw. *Journal of Food Biotechnology*, 22, p.49-97, 1998.
2. BANCO NACIONAL DO DESENVOLVIMENTO (BNDES); CENTRO DE GESTÃO E ESTUDOS ESTRATÉGICOS (CGEE). Bioetanol de cana-de-açúcar: energia para o desenvolvimento sustentável. BNDES: Rio de Janeiro, 2008.
3. BÉGUIM, P., AUBERT, J. P. (1992). Cellulases. *Encyclopedia of Microbiology*, 1: 467 -477. (J. Lederberg, Ed.) New York, N. Y.: Academic Press.
4. BRASIL, J. L.; VAGHETTI, J. C. P.; SANTOS JR, B. R. A.; SIMON, N. M.; PAVAN, F. A.; DIAS, S. L. P.; LIMA, E. C. Planejamento estatístico de experimentos como uma ferramenta para otimização das condições de biossorção de Cu(II) em batelada utilizando-se casca de nozes pecã como biossorvente. *Quimica Nova*, v.30, n.3, p.548-553, 2007.
5. CASTRO, A.; PEREIRA JR, N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Quím. Nova* [online]. 2010, vol.33, n.1, pp. 181-188.
6. DELABONA, P. da S.; PIROTA, R. D. P. B.; TREMACOLDI, C. R.; FARINAS, A. C. S. Isolamento de fungos visando à produção de enzimas celulolíticas para aplicação na hidrólise da biomassa. In: JORNADA CIENTÍFICA-EMBRAPA SÃO CARLOS, 2009, São Carlos, SP. Anais... São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2009. (Embrapa Pecuária Sudeste. Documentos, 90).
7. FENGEL, D.; WEGENER, G. *Wood Chemistry, Ultrastructure and Reactions*, Berlin: Walter de Gruyter, 1989.
8. GEORLETTE, D., BLAISE, V., COLLINS, T, AMICO, S. D., GRATIA, E., HOYOUX, A., MARX, J. C., SONAN, G., FELLER, G., GERDAY, C. (2004). Some like it cold: biocatalysis at low temperatures. *FEMS Microbiology*.

9. GERDAY, C., AITTALEB, M., BENTAHIR, M., CHESSA, J., CLAVERIE, P., COLLINS, T., D'AMICO, S., DUMONT, J., GARSOUX, G., GEORLETTE, D., HOYOUX, A., LONHIENNE, T., MEUWIS, M., FELLER, G. (2000). Coldadapted Enzymes: from fundamentals to biotechnology. *Tibtech*, 18, 103-107.
10. GHOSE, T.K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure & Appl. Chem.*, 59: 257-268.
11. GOLDBECK, R.; RAMOS, M. M.; PEREIRA, G. A. G., MAUGERI-FILHO, F., Cellulase production from a new strain *Acremonium strictum* isolated from the Brazilian Biome using different substrates, *Bioresource Technology*, 66: 797-803, 2013.
12. HARGREAVEZ, P.I. (2008) Bioprospecção de novas celulasas de fungos provenientes da floresta amazônica e otimização de sua produção sobre celulignina de bagaço de cana. Rio de Janeiro.
13. HAULY, M.C.O.; OLIVEIRA, A.S.; SILVA, R.S.S.F.; CAMINOTTO, R. Efeito da glucose-oxidase sobre a produção de celulase. *Semina*. 4(14); 439-443. 1983.
14. HENRISSAT, B.; *Biochem.J.* 1991, 280-309.
15. HOWARD, R.L. et al. (2003). Lignocellulose biotechnology: issues of bioconversion & enzyme production. *African Journal of Biotechnology*, Toronto, v. 2, p. 602-619.
16. KLEMAN-LEYER, K.M.; SIIKA-AHO, M.; TEERI, T.T.; KIRK, T.K., *App. Environ. Microbiol.* 1996, 62, 2883.
17. LEHNINGER, A.L. *Biochemistry: the molecular basis of cell structure and function*. New York: Worth Publishers, 1985, p. 833.
18. LIMA, U. A., 1929 – *Biotechnologia industrial/ Urgel de Almeida Lima – outros coordenadores: Eugênio Aquarone, Walter Borzani, Willibaldo Schmidell – São Paulo: Edgard Blucher, 2001.*
19. LYND, L.R.; WEIMER, P. J.; VAN ZYL, W. H. AND PRETORIUS, I. S., (2002), *Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66: 506–577.
20. MACIEL, G. M.; VANDENBERGHE, L. P. S.; WINDSON, C.; HAMINIUK, R. C. F., BIANCA, B. E. D.; BRANDALIZE, T. Q. S.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Xylanase Production by *Aspergillus niger* LPB 326 in Solid-State

- Fermentation Using Statistical Experimental Designs. Food Technol. Biotech., v. 46, p. 183-189, 2008.
21. ORBERG, P.K. Studies on cellulase production from annual ryegrass straw by *Trichoderma reesei*. Dissertação de mestrado, Oregon State University, Oregon (1995).
  22. OLSSON, L.; HAHN-HÄGERDAL, B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. Applied Microbiology, 18, p. 312-331, 1996.
  23. PANDEY, A.; SOCCOL, C.R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V.T. Biotechnological potential of agro-industrial residues. I: sugarcane bagasse. Bioresour. Technol., v. 74, n.1, p. 69-80, 2000.
  24. PASSARINI, M.R.Z., SANTOS, C., LIMA, N., BERLINCK, R.G.S., SETTE, L.D. (2013) Filamentous fungi from the Atlantic marine sponge *Dragmacidon reticulatum*. Archives of Microbiology, 195:99-111.
  25. PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L.; NAGATA, N. Por que otimização multivariada? Engenharia Sanitária e Ambiental. v.10, n.2, p.106-110, 2005.
  26. PEREIRA-FILHO, E. R., POPPI, R. J.; ARRUDA, M. A. Z. Employment of factorial design for optimization of pirolisys and atomization temperatures for Al, Cd, Mo and Pb determination by ETAAS. Química Nova. v. 25, n. 2, p.246-253, 2002.
  27. PEREIRA JR., N.; COUTO, M.A.P.; SANTA ANNA, L.M.M. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production within the context of biorefinery. Series on Biotechnology, Ed. 1, v. 2, 2008.
  28. POOLE, N.J & PRICE, P.C. The occurrence of *Chrysosporium pannorum* in soils receiving incremental cellulose. **Soil Biology and Biochemistry.**, v.3, p.161-166, 1971.
  29. ROSA, S.E.S.; GARCIA, J.L.F. O etanol de segunda geração: limites e oportunidades. Revista do BNDES, 32, p. 117-156, dezembro 2009.
  30. SANTOS, M.F.R.F.; BORSCHIVER, S.; COUTO, M.A.P.G. Iniciativas para o uso da biomassa lignocelulósica em biorrefinarias: a plataforma sucroquímica no mundo e no Brasil. Economia & Energia. Ano XV-No 82. ISSN 1518-2932. Julho/Setembro de 2011.
  31. SHAHRIARINOUR, M.; WAHAB, M.N.A.; MOHAMAD, R.; MUSTAFA, S.; ARIFF, A.B. Cyanobacterial biomass as N-supplement to oil palm empty fruit

- buncj (OPEFB) fibre for improvement of cellulose production by *Aspergillus terreus* in submerged fermentation. "N-source for cellulose," *BioResources* 6(2), 1696-1706 (2011).
32. SHLESER, R. Ethanol production in Hawaii. State of Hawaii. Energy Division, Department of Business, Economic Development and Tourism. Honolulu HI USA, 62pp, 1994.
33. SIDDIQUI, K.S., CAVICCHIOLI, R. (2006). Cold-Adapted Enzymes. *Annu. Rev. Biochem.*, 75, 403-433.
34. SOUZA, L.G.A. Redes de inovação em etanol de segunda geração/ Luiz Gustavo Antonio de Souza - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. 215 p: Il. Piracicaba, 2013.
35. SOUZA, W. R., PARMA, M. M., SANTOS, S. N., PELLIZARI, V. H., MELO, I. S. de. Isolamento seletivo de *Bacillus* sp. da Antártica e produção de substâncias bioativas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 26., 2011, Foz do Iguaçu. Anais... Foz do Iguaçu: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2011. Resumo 1274-1. 2011.
36. TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M., KUMAR, S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
37. VU, V.H.; KIM, K. Improvement of Cellulase activity using error-prone rolling circle amplification and site-directed mutagenesis. *J. Microbiol. Biotechnol.* 22(5), 607-613, pISSN 1017-7825. 2012.
38. WYMAN, C.E. Ethanol from lignocellulosic biomass: Technology, economics, and opportunities. *Bioresour. Technol.*, v.50, p.3-16, 1994.
39. ZHANG, Y.H.P.; LYND, L.R.; *Biotechnol. Bioeng.* 2004, 88, 797.
40. ZHDANOVA, N.N., ZAKHARCHENKO, V.A., VEMBER, V.V., NAKONECHNAYA, L.T. Fungi from Chernobyl: mycobiota of the inner regions of the containment structures of the damaged nuclear reactor. ***Mycol. Res.***, v.104, p.1421-1426, 2000.



## 7. ANEXOS

### 7.1. Anexo 1- Matriz Codificada Plackett & Burman – 16 ensaios

	Inoculo	CMC	Glicose	Ext. Malte	Peptona	Ext. de levedura	NH4Cl	pH
1	1 (5)	-1 (0)	1 (2%)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	1 (0,2%)	1 (6,5)
2	1 (5)	1 (2%)	-1(0)	1 (2%)	-1 (0)	-1 (0)	0 (-1)	1 (6,5)
3	-1 (3)	1 (2%)	1 (2%)	-1 (0)	1 (0,2%)	-1 (0)	0 (-1)	-1 (4,5)
4	1 (5)	-1 (0)	1 (2%)	1 (2%)	-1 (0)	1 (0,2%)	0 (-1)	-1 (4,5)
5	1 (5)	1 (2%)	-1(-0)	1 (2%)	1 (0,2%)	-1 (0)	1 (0,2%)	-1 (4,5)
6	1 (5)	1 (2%)	1 (2%)	-1 (0)	1 (0,2%)	1 (0,2%)	0 (-1)	1 (6,5)
7	-1 (3)	1 (2%)	1 (2%)	1 (2%)	-1 (0)	1 (0,2%)	1 (0,2%)	-1 (4,5)
8	-1 (3)	-1 (0)	1 (2%)	1 (2%)	1 (0,2%)	-1 (0)	1 (0,2%)	1 (6,5)
9	-1 (3)	-1 (0)	-1 (0)	1 (2%)	1 (0,2%)	1 (0,2%)	0 (-1)	1(6,5)
10	1 (5)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	1 (0,2%)	1 (0,2%)	1 (0,2%)	-1 (4,5)
11	-1 (3)	1 (2%)	-1 (0)	-1 (0)	-1 (0)	1 (0,2%)	1 (0,2%)	1(6,5)
12	-1 (3)	-1 (0)	-1 (0)	-1(0)	-1 (0)	-1 (0)	0 (-1)	-1 (4,5)
13 (C)	0 (4)	0 (1%)	0 (1%)	0 (1%)	0 (0,1%)	0 (0,1%)	0 (0,1%)	0 (5,5)
14 (C)	0 (4)	0 (1%)	0 (1%)	0 (1%)	0 (0,1%)	0 (0,1%)	0 (0,1%)	0 (5,5)
15 (C)	0 (4)	0 (1%)	0 (1%)	0 (1%)	0 (0,1%)	0 (0,1%)	0 (0,1%)	0 (5,5)
16 (C)	0 (4)	0 (1%)	0 (1%)	0 (1%)	0(0,1%)	0 (0,1%)	0 (0,1%)	0 (5,5)

### 7.2. Anexo 2 - Matriz Codificada Plackett & Burman – 16 ensaios

	Inóculo	CMC	Glicose	Ext. malte	Extrato Levedura	NH4Cl
1	1(6)	-1(1%)	1(3%)	-1(1%)	-1(1%)	-1(1%)
2	1(6)	1(3%)	-1(1%)	1(3%)	-1(1%)	-1(1%)
3	-1(4)	1(3%)	1(3%)	-1(1%)	1(0,3%)	-1(1%)
4	1(6)	-1(1%)	1(3%)	1(3%)	-1(1%)	1(0,2%)
5	1(6)	1(3%)	-1(1%)	1(3%)	1(0,3%)	-1(1%)
6	1(6)	1(3%)	1(3%)	-1(1%)	1(0,3%)	1(0,2%)
7	-1(4)	1(3%)	1(3%)	1(3%)	-1(1%)	1(0,2%)
8	-1(4)	-1(1%)	1(3%)	1(3%)	1(0,3%)	-1(1%)
9	-1(4)	-1(1%)	-1(1%)	1(3%)	1(0,3%)	1(0,2%)
10	1(6)	-1(1%)	-1(1%)	-1(1%)	1(0,3%)	1(0,2%)
11	-1(4)	1(3%)	-1(1%)	-1(1%)	-1(1%)	1(0,2%)
12	-1(4)	-1(1%)	-1(1%)	-1(1%)	-1(1%)	-1(1%)
13 (C)	0(5)	0(2%)	0(2%)	0(2%)	0(0,2%)	0(0,0)
14 (C)	0(5)	0(2%)	0(2%)	0(2%)	0(0,2%)	0(0,0)
15 (C)	0(5)	0(2%)	0(2%)	0(2%)	0(0,2%)	0(0,0)
16 (C)	0(5)	0(2%)	0(2%)	0(2%)	0(0,2%)	0(0,0)

### 7.3. Anexo 3- Matriz Codificada Plackett & Bruman – 16 ensaios

	Inóculo	CMC	Glicose	Peptona	NH4Cl	pH
1	1(5)	-1(1%)	1(3%)	-1(1%)	-1(1%)	-1(4,5)
2	1(5)	1(3%)	-1(1%)	1(0,3%)	-1(1%)	-1(4,5)
3	-1(3)	1(3%)	1(3%)	-1(1%)	1(0,3%)	-1(4,5)
4	1(5)	-1(1%)	1(3%)	1(0,3%)	-1(1%)	1(6,5)
5	1(5)	1(3%)	-1(1%)	1(0,3%)	1(0,3%)	-1(4,5)
6	1(5)	1(3%)	1(3%)	-1(1%)	1(0,3%)	1(6,5)
7	-1(3)	1(3%)	1(3%)	1(0,3%)	-1(1%)	1(6,5)
8	-1(3)	-1(1%)	1(3%)	1(0,3%)	1(0,3%)	-1(4,5)
9	-1(3)	-1(1%)	-1(1%)	1(0,3%)	1(0,3%)	1(6,5)
10	1(5)	-1(1%)	-1(1%)	-1(1%)	1(0,3%)	1(6,5)
11	-1(3)	1(3%)	-1(1%)	-1(1%)	-1(1%)	1(6,5)
12	-1(3)	-1(1%)	-1(1%)	-1(1%)	-1(1%)	-1(4,5)
13 (C)	0(4)	0(2%)	0(2%)	0(0,2%)	0(0,2%)	0(5,5)
14 (C)	0(4)	0(2%)	0(2%)	0(0,2%)	0(0,2%)	0(5,5)
15 (C)	0(4)	0(2%)	0(2%)	0(0,2%)	0(0,2%)	0(5,5)
16 (C)	0(4)	0(2%)	0(2%)	0(0,2%)	0(0,2%)	0(5,5)

### 7.4. Anexo 4-Matriz Codificada Plackett & Bruman – 16 ensaios

	CMC	Glicose	Ext. Malte	Ext. Levedura	CaCl2	Sacarose
1	-1(1%)	1(2%)	-1(1%)	-1(1%)	-1(1%)	-1(1%)
2	1(3,5%)	-1(1%)	1(3,5%)	-1(1%)	-1(1%)	-1(1%)
3	1(3,5%)	1(2%)	-1(1%)	1(0,3%)	1(0,3%)	-1(1%)
4	-1(1%)	1(2%)	1(3,5%)	-1(1%)	-1(1%)	1(2%)
5	1(3,5%)	-1(1%)	1(3,5%)	1(0,3%)	1(0,3%)	-1(1%)
6	1(3,5%)	1(2%)	-1(1%)	1(0,3%)	1(0,3%)	1(2%)
7	1(3,5%)	1(2%)	1(3,5%)	-1(1%)	-1(1%)	1(2%)
8	-1(1%)	1(2%)	1(3,5%)	1(0,3%)	1(0,3%)	-1(1%)
9	-1(1%)	-1(1%)	1(3,5%)	1(0,3%)	1(0,3%)	1(2%)
10	-1(1%)	-1(1%)	-1(1%)	1(0,3%)	1(0,3%)	1(2%)
11	1(3,5%)	-1(1%)	-1(1%)	-1(1%)	-1(1%)	1(2%)
12	-1(1%)	-1(1%)	-1(1%)	-1(1%)	-1(1%)	-1(1%)
13 (C)	0(2,5%)	0(1%)	0(2,5%)	0(0,2%)	0(0,2%)	0(1%)
14 (C)	0(2,5%)	0(1%)	0(2,5%)	0(0,2%)	0(0,2%)	0(1%)
15 (C)	0(2,5%)	0(1%)	0(2,5%)	0(0,2%)	0(0,2%)	0(1%)
16 (C)	0(2,5%)	0(1%)	0(2,5%)	0(0,2%)	0(0,2%)	0(1%)

### 7.5 Anexo 5 - Codificada Plackett & Bruman – 16 ensaios

	CMC	Glicose	Peptona	NH4Cl	Sacarose	pH
1	-1(1%)	1(2%)	-1(1%)	-1(1%)	-1(1%)	-1(4,5)
2	1(3,5%)	-1(1%)	1(0,3%)	-1(1%)	-1(1%)	-1(4,5)
3	1(3,5%)	1(2%)	-1(1%)	1(0,3%)	1(2%)	-1(4,5)
4	-1(1%)	1(2%)	1(0,3%)	-1(1%)	-1(1%)	1(6,5)
5	1(3,5%)	-1(1%)	1(0,3%)	1(0,3%)	1(2%)	-1(4,5)
6	1(3,5%)	1(2%)	-1(1%)	1(0,3%)	1(2%)	1(6,5)
7	1(3,5%)	1(2%)	1(0,3%)	-1(1%)	-1(1%)	1(6,5)
8	-1(1%)	1(2%)	1(0,3%)	1(0,3%)	1(2%)	-1(4,5)
9	-1(1%)	-1(1%)	1(0,3%)	1(0,3%)	1(2%)	1(6,5)
10	-1(1%)	-1(1%)	-1(1%)	1(0,3%)	1(2%)	1(6,5)
11	1(3,5%)	-1(1%)	-1(1%)	-1(1%)	-1(1%)	1(6,5)
12	-1(1%)	-1(1%)	-1(1%)	-1(1%)	-1(1%)	-1(4,5)
13 (C)	0(2,5%)	0(1%)	0(0,2%)	0(0,2%)	0(1%)	0(5,5)
14 (C)	0(2,5%)	0(1%)	0(0,2%)	0(0,2%)	0(1%)	0(5,5)
15 (C)	0(2,5%)	0(1%)	0(0,2%)	0(0,2%)	0(1%)	0(5,5)
16 (C)	0(2,5%)	0(1%)	0(0,2%)	0(0,2%)	0(1%)	0(5,5)

### 7.6 Anexo 6 – Codificação Fatorial Fracionado 2<sup>4-1</sup>

Ensaio	CMC	Ext. Malte	Ext. Levedura	Sacarose
1	-1 (1%)	-1 (1%)	-1 (1%)	-1 (1%)
2	1 (4%)	-1 (1%)	-1 (1%)	1 (3%)
3	-1 (1%)	1 (4%)	-1 (1%)	1 (3%)
4	1 (4%)	1 (4%)	-1 (1%)	-1 (1%)
5	-1 (1%)	-1 (1%)	1 (0,4%)	1 (3%)
6	1 (4%)	-1 (1%)	1 (0,4%)	-1 (1%)
7	-1 (1%)	1 (4%)	1 (0,4%)	-1 (1%)
8	1 (4%)	1 (4%)	1 (0,4%)	-1 (1%)
9	0 (2%)	0 (2%)	0 (0,2%)	0 (1,75%)
10	0 (2%)	0 (2%)	0 (0,2%)	0 (1,75%)
11	0 (2%)	0 (2%)	0 (0,2%)	0 (1,75%)