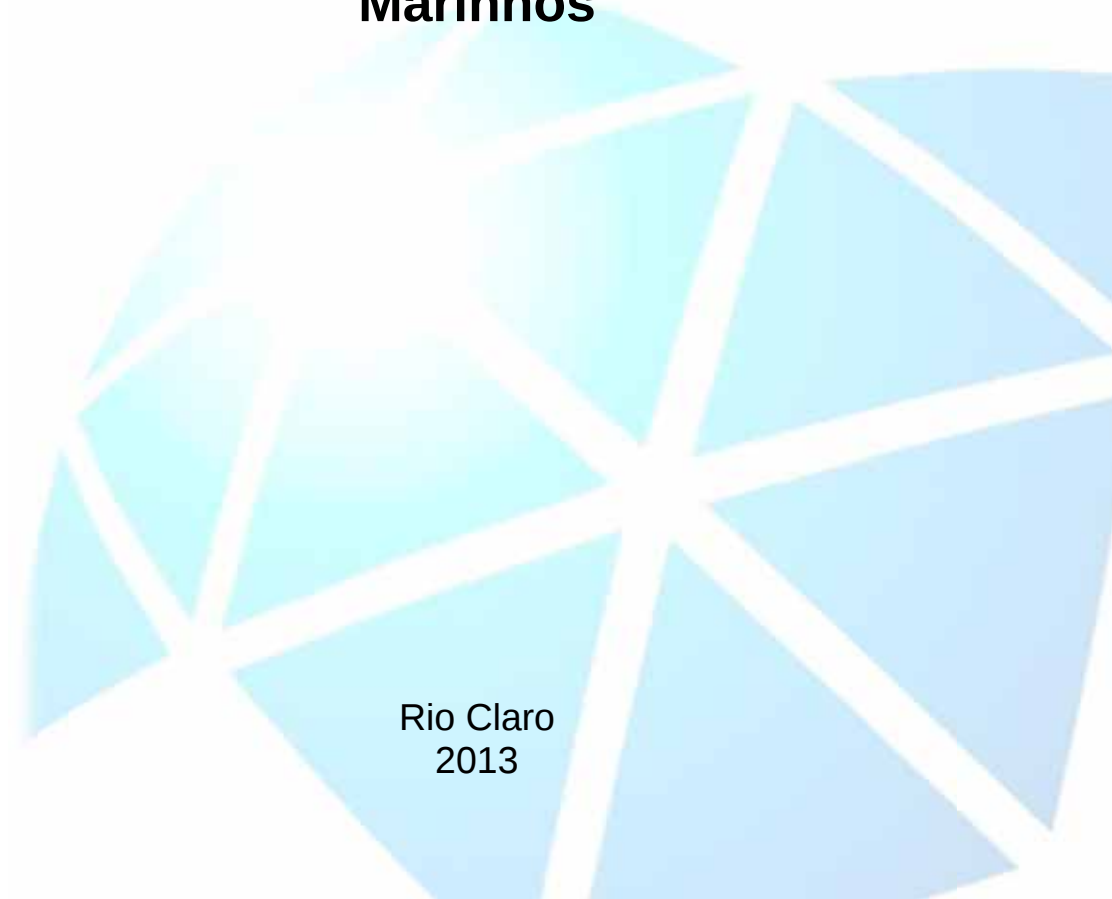

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RAMON PERES BREXÓ

**Produção de Enzimas Ligninolíticas,
Glooxal Oxidase e Proteases por Fungos
Marinhos**



Rio Claro
2013

RAMON PERES BREXÓ

Produção de Enzimas Ligninolíticas, Glioxal Oxidase e Proteases por
Fungos Marinhos

Orientador: 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
2013

589.2 Brexó, Ramon Peres
B847p Produção de enzimas ligninolíticas, Glioxal Oxidase e
Proteases por fungos marinhos / Ramon Peres Brexó. - Rio
Claro, 2013
52 f. : il., figs., tabs., fots.

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências de Rio Claro
Orientador: Lara Durães Sette

1. Fungos. 2. Triagem. 3. Otimização. 4. Processos
enzimáticos. 5. Marinho. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

Aos meus pais Sérgio Brexó e Sueli Lopes Peres Brexó, por todo carinho, amor e por todo investimento pessoal transmitidos para a construção de um indivíduo dotado de persistência e cheio de objetivos, não sendo capaz de traduzir em palavras o tamanho da minha gratidão à vocês.

À minha irmã Gisele Peres Bertholdo por ter gerado a sobrinha mais linda do mundo, a Sofia. Vocês foram e sempre serão a minha motivação para superar os tempos difíceis, o pontapé para me arriscar e tomar decisões, e a base para aquele sorriso de satisfação de dever cumprido.

Ao meu irmão Adan Peres Brexó por me ensinar a ver a vida com outros olhos, sendo sempre de muitos amigos e poucas preocupações, buscando a felicidade em coisas simples.

À minha tia Inocência (in memorian), que pra mim era a Vó Cinha, que se fez sempre muito presente, mostrando que a família é o bem maior que podemos cultivar. Às tias (primas) Marlene e Marli, por estarem comigo desde criança, mostrando que o amor e a criatividade é capaz de transformar qualquer realidade, sem esquecer da felicidade que era minha infância quando vocês chegavam em casa, me apoiando sempre com os estudos e com as artes. Tia Lena e a prima Mônica, que por muito tempo foram minhas mães de final de semana, cuidando e me mimando tanto. E mencionando minha grande família, não posso deixar de dedicar este trabalho aos meus padrinhos tio Márcio e tia Angela, além das tias Pirda, Pê, por tornar nossos encontros tão especiais, sem deixar de mencionar a minha tão querida vó Nina (in memorian), representação típica e literal de braveza, força e garra, devo a ela muito da minha personalidade.

Aos meus amigos, companheiros e loucos por música e bandas instrumentais, que fizeram a FANJYPE (Fanfarra Juvenil dos Ypês) ser algo tão especial e diferente na minha história de vida.

Às minhas companheiras de graduação Isabela Calegari Moia e Renata Lamos, por me aguentar desde nossos primeiros dias de “disk bixo”, nos trabalhos, nos dramas, nas festas, e por estarem comigo até na mesma área de atuação. E não deixando de fora a Nathalia Lorenzon, que chegou depois no nosso grupo já entrando pra história, cheia da alegria e de personalidade.

Às minhas vizinhas de kitnet Emília Arthur Notalgiacomo e Juliana Paneczko Jurgilas, que me fazem companhia, me trazem felicidade e compartilham o cotidiano universitário comigo, bem como a Giuliana Garcia que não é vizinha, mas está sempre entre nós, com muito carinho. E não poderia deixar de incluir meus conterrâneos João Rodolfo Tuckumantel Valim e Isabelle Bueno Silva, amigos, companheiros, e apoiadores das minhas loucuras e sonhos.

Ao professor Dr. Flávio Henrique Caetano por me tutorar sempre na premissa de incentivar a criatividade e meus devaneios, me apoiando e permitindo reconhecê-lo além do vínculo acadêmico, como uma pessoa dotada de muitos talentos.

Ao meu co-orientador Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini, por me acompanhar e permitir o conhecimento e a vivência da rotina dos pesquisadores do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA – UNICAMP), aumentando as minhas perspectivas como pesquisador e como ser humano.

À minha professora e orientadora Dra. Lara Sette Durães, por acreditar nas minhas atribuições desde o princípio, possibilitando o início das minhas atividades científicas no CPQBA, experiência que jamais me esquecerei, dando espaço e respaldo para que eu pudesse opnar e conduzir o projeto com personalidade, sempre me orientando de maneira profissional e prestativa, sem deixar de ser amiga.

E finalmente a Deus, por ter me dado força durante esses quatro anos de curso, por ter me iluminado nas decisões mais difíceis e por ter me guiado pelo caminho mais correto possível.

Dedico.

Agradecimento

Ao instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de Rio Claro, perante todo o corpo docente da universidade, os principais responsáveis por nossos valores e conhecimentos teóricos, técnicos e práticos, visando formar com excelência pelas tribuições que um bom profissional de biologia deve apresentar.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de iniciação científica, bem como pelo auxílio à pesquisa que possibilitou a realização desse trabalho.

“Eu gosto do impossível porque lá a concorrência é menor”.

(Walt Disney)

RESUMO

Os fungos filamentosos derivados de ambientes marinhos são promissores para exploração biotecnológica, visto que, este habitat cobre mais de 70% da superfície do planeta e por ser a micologia marinha uma ciência recente onde pouco se conhece sobre a biodiversidade e os potenciais recursos genéticos provenientes desses organismos. Atualmente, a análise e aplicação da capacidade catabólica de micro-organismos é promissora na degradação de compostos poluentes ambientais, além de apresentar grande aplicabilidade em processos industriais. Considerando essas tendências, o presente projeto associado ao Temático da Fapesp 2010/50190-2 “Investigação do potencial biotecnológico e metabólico de organismos marinhos para processos de biorremediação e produção de substâncias com atividades antivirais, anti-Leishmania e anti-inflamatória”, tem como finalidade analisar a produção das enzimas ligninolíticas Lignina Peroxidase (**LiP**) e Manganês Peroxidase (**MnP**), e da enzima Glioxal Oxidase (**GLOX**), bem como avaliar a produção de proteases, devido à potencialidade dessas enzimas na aplicação biotecnológica de diversos setores sócio-econômicos como a biorremediação de efluentes de indústria têxtil, degradação de explosivos nitrados, pesticidas, polímeros e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, bem como na indústria de papel e celulose, de alimentos, de couro, farmacêutica, cosmética, entre outras.

Palavras-chave: Enzimas; Fungos; Marinho; Triagem; Otimização.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	Lignina peroxidase (LiP)	10
1.2	Manganês peroxidases (MnP)	11
1.3	Glioxal oxidase (GLOX)	12
1.4	Proteases	12
1.4.1.	Exopeptidases	13
1.4.2.	Endopeptidases	13
2	Objetivos	15
2.1	Objetivos Específicos	15
3	METODOLOGIA	16
3.1	Micro-organismos	16
3.2	Condições de cultivo	16
3.3	Atividades enzimáticas	17
3.4	Taxonomia molecular	19
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1	Manganês peroxidase, Lignina Peroxidase e Glioxal Oxidase.	20
4.1.1	Comparação de meio de cultura para as enzimas lignolíticas	23
4.2	Proteases	25
4.2.1	Identificação molecular da linhagem M36	28
4.2.2	Parâmetros para otimização das condições de cultivo para protease	28
5	DESENHO EXPERIMENTAL	30
5.1	Plackett-Burman (P&B)	30
5.2	Fatorial Fracionado	35
5.3	Delineamentos composto central rotacional (DCCR)	40
5.4	Evolução e validação do desenho experimental	43
6	CONCLUSÃO	45
	Referências	46

1 INTRODUÇÃO

Os metabólitos extracelulares são moléculas muito importantes para o desenvolvimento dos fungos em seu habitat natural, sendo os principais as enzimas celulases, hemicelulases, pectinases e ligninases, pois permitem o acesso aos polissacarídeos das plantas (celulose e hemicelulose), os quais servem como fonte primária de carbono e energia (Aro et al., 2005; Steffen et al., 2002), além de contribuir para a ação fúngica patogênica à células vegetais e animais (Aro et al., 2005).

Os fungos degradadores da madeira conhecidos como fungos ligninolíticos são taxonomicamente diversos e a maioria deles pertence ao filo Basidiomycota. São comumente divididos em três classes, de acordo com a morfologia da degradação que produzem: fungos de degradação branda, fungos de degradação marrom e fungos de degradação branca, sendo esta última a mais importante, uma vez que são altamente ligninolíticos (Durán & Esposito 2008; Sette et al., 2008).

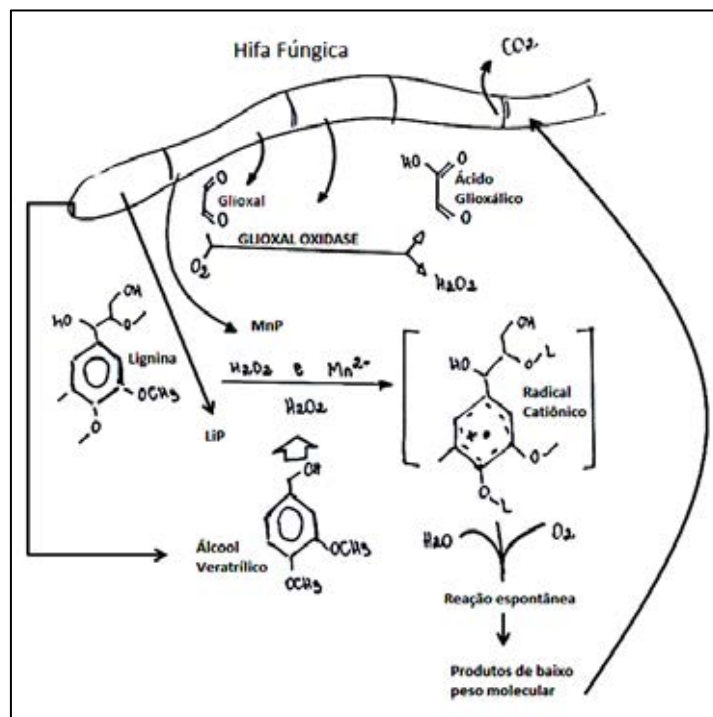
As enzimas ligninolíticas produzidas por esses fungos são as mais efetivas para degradar a lignina e compostos estruturalmente parecidos com a lignina em ambientes onde os níveis de nutrientes estão baixos (Hamman, 2004), ou seja, acontece durante o metabolismo secundário quando os nutrientes (C, N e S) tornam-se limitantes (Kirk & Farrel, 1987), característica vantajosa para os fungos que habitam lugares altamente contaminados com uma produtividade muito baixa devido a níveis tóxicos de organopoluente (Hamman, 2004).

A ação das enzimas ligninolíticas (LMEs), "combustão enzimática" como é conhecida, é a base da degradação da lignina por fungos de podridão branca, geradores de reações oxidativas altamente reativas devido aos radicais livres (Kirk & Farrell, 1987), através da Lignina Peroxidase (**LiP**), Manganês Peroxidase (**MnP**) (Martínez, 2002)(Hammel & Cullen, 2008), além de enzimas envolvidas na produção de peróxido de hidrogênio, como Glioxal Oxidase (**GLOX**), também consideradas membros da maquinaria de degradação da podridão branca (Lundell, 1993; de Jong et al., 1994, Kersten & Cullen, 2007).

A lignina é despolimerizada fora das hifas fúngicas pela ação combinada de LMEs oxidativo (Figura 1), radicais livres de oxigênio e metabólitos pequenos resultante de fragmentos mineralizadas intracelularmente (Lundell, 1993; Hofrichter et al., 1999b, Kapich et al., 1999; Hatakka, 2001; Hammel & Cullen 2008). Por reações catalíticas dependente de H_2O_2 (que catalisam a oxidação de um elétron inicial de compostos aromáticos), compostos fenólicos e não fenólicos presentes na infra-estrutura da lignina podem ser degradados pela

clivagem de carbonos (α C- β C) aromático, reações de oxidação do anel e clivagem dentro de dímeros de lignina (Kirk & Farrell, 1987; Lundell et al. 1993, Schoemaker et al. 1994).

Figura 1. Esquema geral do processo de degradação da lignina.



Fonte: Adaptado de Kirk and Cullen (1993).

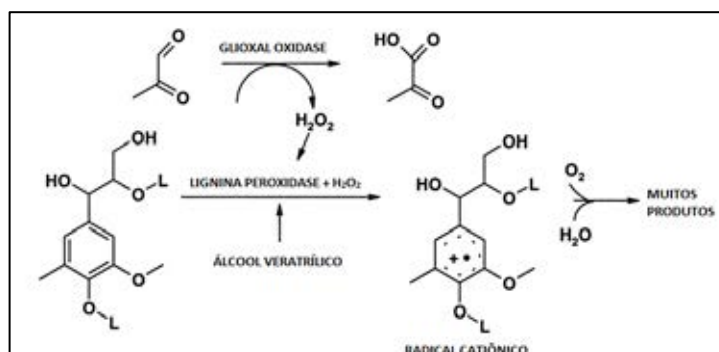
Kaushi e Malik (2009) descrevem diferentes estudos que mostram que os fatores bióticos e abióticos podem interferir na degradação fúngica de contaminantes em resposta à produtividade enzimática aumentada, tais fatores são pH, concentração do contaminante, classe do contaminante, meio de cultivo, agitação, temperatura, entre outros.

1.1 LIGNINA PEROXIDASE (LIP)

A LiP ocorre em muitos fungos de degradação branca e foi a primeira enzima ligninolítica a ser descoberta por Tien & Kirk (1984). É uma glicoproteína, que contém ferroprotoporfirina como grupo prostético e requer peróxido de hidrogênio para sua atividade catalítica (Gold & Alic, 1993), com um alto potencial de oxidação de substratos fenólicos e não fenólicos. A LiP de *P. chrysosporium* apresenta múltiplas formas e massas moleculares entre 38-43 kDa dependendo do tipo de linhagem e das condições de cultura (Gold et al., 1989). Diferentes LiPs mostraram capacidade de mineralizar vários compostos aromáticos recalcitrantes, de oxidar numerosos policíclicos aromáticos, além do compostos fenólicos e não fenólicos

(Duran & Esposito, 2000), bifenilas policloradas e diversos corantes (Wesenberg et al., 2003).

Figura 2. Reação simplificada da Lignina Peroxidase e Glioxal Oxidase.

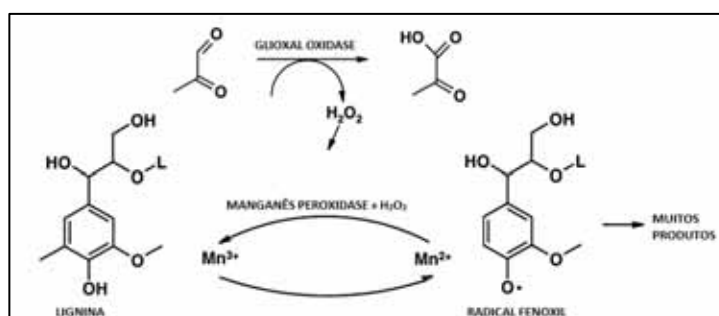


Fonte: Adaptado de Kirk and Cullen (1998).

1.2 MANGANÊS PEROXIDASES (MNP)

A segunda LME descoberta, também em *P. chrysosporium* (Kuwahara et al., 1984), a MnP é uma glicoproteína dependente também de H_2O_2 para sua atividade, apresenta um grupo prostético heme no sítio ativo e massas moleculares que variam entre 45-47 kDa. Estas enzimas apresentam ação extracelular (Gold et al., 1989), requerindo Mn^{2+} que é oxidado a Mn^{3+} , que por sua vez, oxida substratos orgânicos como fenóis e radicais fenóxil (Kuwahara et al., 1984). As MnPs de fungos causadores da podridão branca vêm sendo empregadas em estudos de biodegradação da lignina (Hilden et al., 2000), hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (Wang et al., 2003), corantes sintéticos (Heinfling et al., 1998) e poluentes clorados (Haas et al., 2004).

Figura 3. Reação simplificada da Manganês Peroxidase e Glioxal Oxidase.



Fonte: Adaptado de Kirk and Cullen (1998).

1.3 GLIOXAL OXIDASE (GLOX)

Tanto a Lignina Peroxidase (**LIP**) quanto a Manganês Peroxidase (**MnP**) são enzimas lignolíticas que usam o H_2O_2 como aceptor de elétrons em seus ciclos catalíticos, sendo proposto pelo abastecimento de peróxido de hidrogênio através de Glicose oxidase-1, Glicose oxidase-2, Ácido Graxo acil-CoA oxidase, e metanol oxidase que são oxidases intracelulares com eficiência limitada no fornecimento extracelular devido a ação das catalases intracelulares (Nishida, A. & Eriksson, K.-E.,1987)(Greene & Gould,1983). O co-substrato peróxido de hidrogênio para as reações de peroxidases deve ser gerado *in situ* com volume extracelular eficiente, função desempenhada por glioxal oxidase.

A Glioxal Oxidase (**GLOX**) é uma glicoproteína ácida monomérica com uma massa molecular de cerca de 57 kDa calculada a partir da sequência de nucleotídeos (Kersten, & Cullen ,1993), produtora de H_2O_2 , que apresenta uma estimulação acentuada na atividade quando incubada com Cu^{2+} , também encontrada em culturas ligninolíticas (Kersten, 1990).

Traços de GLOX correlacionam temporalmente à presença de substratos das peroxidases, sugerindo uma estreita ligação fisiológica entre elas, um evidente co-mecanismo extracelular de regulação para o controle da produção de H_2O_2 e suprimento para as peroxidases. Portanto, a taxa de biodegradação das enzimas lignolíticas pode ser um reflexo da limitação de velocidade na ação de enzimas oxidativas, tais como GLOX, comprovada em um estudo com várias linhagemlinhagens de *P. chrysosporium* que indicaram estimulação na oxidação da lignina na presença de H_2O_2 (Kirk et al., 1986).

1.4 PROTEASES

Os micro-organismos proteolíticos parecem ser as mais promissoras fontes de proteases, por produzirem uma maior variedade de enzimas específicas, em comparação às plantas ou aos animais (Diniz & Martin, 1999) e sua produção acontece durante o metabolismo secundário quando os nutrientes (C, N e S) tornam-se limitantes (Cohen, 1973; Harvey et al., 1998; McNeil et al. , 1998), assim como acontece com as enzimas ligninolíticas. As proteases apresentam grande diversidade bioquímica, sendo facilmente manipuláveis, favorecendo dessa maneira suas aplicações biotecnológicas, principalmente as fúngicas, pois apresentam vantagens como fácil obtenção e recuperação (Kumar et al., 2005).

Constituem um dos mais importantes grupos de enzimas industriais (Singh et al. 2007) representando aproximadamente 60% do total de enzimas comercializadas no mundo (Banerjee et al. 1999). São enzimas amplamente utilizadas devido às suas aplicações

biotecnológicas com um elevado impacto econômico (Cruz Ramírez et al. 2010), com aplicação na indústria de detergentes, de cerveja, de couro, têxtil farmacêutica e alimentícia como na coagulação do leite para produção de queijos, agente hidrolítico na maturação de queijos, tenderização de carnes, panificação, entre outras (Horikoshi, 1999; Kanekar et al. 2002; Phadatare et al. 1993).

A impossibilidade das proteases de plantas e animais atenderem à demanda mundial de enzimas tem levado a um interesse cada vez maior pelas proteases de origem microbiana, que contam com aproximadamente 40% das vendas mundiais. Proteases de origem microbiana são preferidas às enzimas de plantas e animais, uma vez que elas possuem a maioria das características desejadas para aplicação em biotecnologia (Rao et al., 1998).

Alguns micro-organismos produzem uma quantidade baixa de enzimas dificultando sua aplicação industrial, porém, na maioria dos casos, adotando-se métodos simples como a utilização de um meio de cultura específico e otimizado, é possível aumentar significativamente o rendimento enzimático (Kumar & Takagi, 1999).

As proteases são enzimas da classe 3, as hidrolases, e subclasse 3.4, as peptídeo-hidrolases ou peptidases, que catalisam a quebra das ligações peptídicas em proteínas, e constituem duas grandes famílias de enzimas, as exopeptidases e as endopeptidases.

1.4.1. EXOPEPTIDASES

Exopeptidases (EC 3.4.11-19) são classificadas de acordo com a posição da ligação peptídica a ser clivada na cadeia peptídica. Neste caso, atuam somente nos finais das cadeias polipeptídicas na região N ou C terminal, como as aminopeptidases, dipeptidil peptidases, tripeptidil-peptidases, carboxipeptidases, peptidil-dipeptidases, dipeptidases (Beynon & Bond, 1989).

1.4.2. ENDOPEPTIDASES

Endopeptidases ou proteinases (EC 3.4. 21-99) atuam preferencialmente nas regiões internas da cadeia polipeptídica, entre as regiões N e C terminal. A presença de grupos α -amino ou α -carboxila tem um efeito negativo na atividade dessa classe de enzima. Elas podem ser subdivididas de acordo com o grupo reativo no sítio ativo envolvido com a catálise em serina-endopeptidase, cisteína-endopeptidase, aspártico-proteinases ou endopeptidases, e metaloproteinases ou metaloendopeptidases, além das enzimas cujo mecanismo de ação não está completamente elucidado são classificadas no subgrupo EC. 3.4.99. (Beynon & Bond, 1989).

Considerando o fato de que pouco se conhece sobre a biodiversidade e recursos genéticos dos fungos derivados de ambientes marinhos e que o mercado mundial vem apresentando cifras crescentes na comercialização de enzimas (montantes movimentados da ordem de US\$ 400 milhões, US\$ 1 bilhão e US\$ 2 bilhões nos anos 1983, 1995 e 2007, respectivamente) (Bon et al., 2008), o estudo do potencial produtivo de enzimas a partir de micro-organismos marinhos devem ser estimulados. Neste contexto, o grupo de pesquisa da Profa. Dra. Lara Sette vem desenvolvendo e participando de projetos de pesquisas relacionados à caracterização de fungos marinhos (da Silva et al., 2008; Menezes et al., 2010; Passarini et al., 2013) e exploração do potencial biotecnológico deste grupo de micro-organismo principalmente no que diz respeito à produção de enzimas de interesse ambiental e industrial (Sette et al., 2008; Bonugli-Santos et al., 2010a; Bonugli-Santos et al. 2010b), degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Bonugli-Santos et al., 2009; Passarini et al., 2010; Passarini et al., 2011; Bonugli-Santos et al. 2011a) e descoloração de corantes e efluentes têxteis (da Silva et al., 2008; Bonugli-Santos et al., 2011b).

Os resultados do presente trabalho além de ressaltar novos recursos genéticos a serem aplicados em processos que requeiram a tolerância a condições salinas, ampliam o conhecimento sobre as enzimas produzidas por fungos derivados marinhos.

2 OBJETIVOS

Realizar a triagem in vitro a partir de noventa e oito fungos (Projeto FAPESP 2008/06720-7) provenientes de ambiente marinho, quanto à produção de LiP, MnP, GLOX e Proteases. Posteriormente, submetido à otimização da produção enzimática por meio de desenho experimental para o melhor produtor da triagem inicial, visando a possível obtenção de novos recursos genéticos derivados marinhos com potencial aplicação biotecnológica.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Reativar dez linhagens de fungos marinhos isoladas da esponja *Dragmacidon reticulata*, os quais foram previamente selecionados devido à capacidade de produção da enzima lacase para avaliação das enzimas ligninolíticas e Glox, além de reativar outras 88 linhagens não produtora de lacase também provenientes da esponja, totalizando 98 fungos filamentosos submetidos à triagem para protease.
- Avaliar a influência de diferentes parâmetros na produção enzimática pelo fungo selecionado visando à otimização da produção através de desenho experimental.

3 METODOLOGIA

3.1 MICRO-ORGANISMOS

Os 98 fungos marinhos utilizados no projeto foram isoladas da esponja *Drarmacidon reticulata*, provenientes do projeto de doutorado de Michel Rodrigo Zambrano Passarini intitulado "Caracterização da diversidade de fungos filamentosos associados a esponjas marinhas e avaliação da produção de lacase" (Projeto Fapesp 2008/06720-7).

Para os testes enzimáticos das enzimas ligninolíticas e Glox, foram utilizados dez fungos previamente selecionados devido à capacidade de produção da enzima lacase pelo projeto de doutorado mencionado, enquanto que os testes para as proteases, a triagem e quantificação enzimática abordou a totalidade das cepas disponíveis para o projeto.

3.2 CONDIÇÕES DE CULTIVO

Para as enzimas lignolíticas e Glox os isolados foram crescidos em meio Ágar Malte 2% (MA2: 2% de extrato de malte e 2% de ágar) acrescidos de 3% de NaCl, dos quais 2 cilindros de 5 mm de diâmetro da margem das colônias foram transferidos para frascos Erlenmeyer de 50 mL contendo 20 mL de caldo MA2+3% NaCl que serviram como pré-inóculo para inoculação de frascos de Erlenmeyer de 125 mL contendo 30 mL caldo MA2+3%NaCl. Para obtenção dos extratos enzimáticos lignolíticos após 7, 14 e 21 dias o meio líquido de cultivo foi centrifugado (centrífuga Hettich Zentrifugem, Rotina 380R) a 10.000 rpm por 30 minutos a 4°C .

Para o levantamento do melhor meio de cultivo para as linhagens selecionadas como as melhores produtoras das enzimas lignolíticas (D4 e M34), foram crescidas em meio Ágar Malte 2% (MA2: 2% de extrato de malte e 2% de ágar) + 3%NaCl, do qual 2 cilindros de 5 mm de diâmetro da margem das colônias foram transferidos para Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL dos meios escolhido para análise Malte ASW (g/L): 20g malte, 11,91g $MgCl_{12} \cdot H_2O$, 1,66g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0,22g $SrCl_2 \cdot H_2O$, 26,319g NaCl, 4,409 Na_2SO_4 , 0,745g KCl, 0,216g $NaHCO_3$, 0,108g KBr, 0,029g H_3BO_3). Os ensaios foram conduzidos por 7, 14 e 21 dias a 28°C e sob agitação de 140 rpm. Para obtenção dos extratos enzimáticos, o meio líquido de cultivo centrifugado a 10.000 rpm por 30 minutos a 4°C em centrifuga Hettich Zentrifugem, Rotina 380R. Todos os ensaios quantitativos foram realizados em triplicata.

Para as proteases, os isolados foram crescidos em meio Skim Milk (200ml de Skim milk (20g/L), 200ml de ágar (20g/L) e 600 ml de tampão fosfato 0,2M, em pH 7,0). Após o crescimento dos fungos em meio sólido, foram retirados 2 cilindros de 5 mm em diâmetro da margem das colônias e transferidos para frascos de Erlenmeyer de 150 mL contendo 40 mL

do meio descrito por Savitha et al (2007) (composição em g/l): 7,0 KH₂PO₄, 2,0 Na₂HPO₄, 1,5 MgSO₄.7H₂O, 1,0 extrato de levedura, 0,1 CaCl₂.2H₂O, 0,008 FeCl₂.4H₂O, 0,0001 ZnSO₄.7H₂O, 1,5 diammonium tartarate, com o pH ajustado para 4,0 (proteases ácidas) e 8,0 (proteases alcalinas), e como fonte de nutrientes para o desenvolvimento dos fungos, foi adicionado 10g/L de peptona bacteriológica.

Para o planejamento experimental visando otimização da produção de protease pelo fungo M36, foi realizado cultivo em meio Ágar Malte 2% (MA2: 2% de extrato de malte e 2% de ágar), do qual os cilindros de 5 mm de diâmetro da margem das colônias foram transferidos para Erlenmeyers de 250 mL contendo 50 mL dos meios elaborados a partir das matrizes com as variáveis aplicadas no delineamento experimental (sessão 5 deste projeto). Os ensaios foram conduzidos por 7 dias a 28°C e sob agitação de 140 rpm. Para obtenção dos extratos enzimáticos o meio líquido de cultivo centrifugado a 10.000 rpm por 30 minutos a 4°C em centrifuga Hettich Zentrifugem, Rotina 380R. Todos os ensaios quantitativos foram realizados em triplicata.

3.3 ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

A atividade da **Lignina Peroxidase (LiP)** foi avaliada por espectrofotometria UV/VIS (Shimadzu UV1249, Kyoto, Japão) a partir do aldeído veratrílico produzido ($\epsilon_{310}^{TM} = 9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) na oxidação do álcool veratrílico que foi usado como substrato. A mistura contendo 1 mL de tampão tartarato de sódio 125 mM pH 3,0, 0,5 mL de álcool veratrílico 10mM, 0,5 mL de peróxido de hidrogênio 2 mM e 0,5 mL do extrato enzimático, teve a reação iniciada com a adição de peróxido de hidrogênio e o aparecimento do aldeído veratrílico foi determinado lendo-se a absorbância à 310 nm após 5 minutos de reação (Arora & Gill, 2001).

A **Manganes Peroxidase (MnP)** foi quantificada através da oxidação do vermelho de fenol a 610 nm. A mistura da reação composta de 0,5 mL de solução de extrato enzimático, 0,1 mL de vermelho de fenol (0,01%), 0,1 mL de lactato de sódio (0,25 M), 0,2 mL de albumina bovina (0,5%), 50 µl MnSO₄ (2 mM), 50 µl de peróxido de hidrogênio em tampão succinato de sódio (20 mM; pH 4,5) foi lida por espectrofotometria UV/VIS e incubada a temperatura ambiente por 5 minutos e a reação interrompida pela adição de 40 µl de NaOH (2 N) e analisada novamente. ($\epsilon_{610}^{TM} = 4.460 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Kuwahara et al. 1984).

A atividade da **Glioxal Oxidase (GLOX - EC 1.2.3.5)** foi determinada através da oxidação da metilglioxal (Kersten & Kirk, 1987 – adaptado) pelo aumento da absorbância a 436 nm. A reação ocorreu a partir da mistura de: 50µL de sobrenadante das amostras recolhidas, 50µL de solução stock (100x) de 2,8 mM guaiacol (Sigma, Aldrich); 50 µL de

1mgL⁻¹ de solução de peroxidase (Merck), 250µL de metilglioxal (acetilformaldeído, Sigma) e 600µL de solução tampão de ácido cítrico/hidrogenofosfato de sódio de pH 6,0. A amostra foi lida em $\Delta t = 0$, e após 10 minutos.

A unidade enzimática (U) para a LiP, MnP e GLOX foi definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 µmol de substrato por minuto de reação. A atividade enzimática foi expressa em U/L do caldo enzimático e os cálculos realizados a partir da equação 1 :

$$(U/L) = (\Delta A) \times V \times 10^6 / \epsilon \times R \times t \quad (1)$$

No qual:

ΔA – Diferença entre absorbância final e inicial

V – Volume da reação (em L)

10⁶ – Conversão de mols do ϵ em µmols

ϵ – Coeficiente de extinção (M⁻¹cm⁻¹)

R – Quantidade de caldo enzimático (L)

T - Tempo de reação (min.)

A atividade enzimática das **Proteases** foi realizada em meio líquido com o substrato azocaseína utilizando a metodologia adaptada de Charney e Tomarelli (1947), após a seleção dos fungos proteolíticos (determinada pela pelas medidas do halo enzimático característico em meio Skim Milk sólido com régua e paquímetro), seguindo a metodologia descrita, foi retirada duas amostras do extrato enzimático, ficando uma delas em banho fervente por 15 minutos (para inativação) e a outra preservada à 5°C. Após esse processo, foi preparado as triplicatas em tubos de ensaio com a adição de 0,5 mL de extrato enzimático (ativo ou inativo), 0,5 mL de azocaseína, 0,5% em tampão acetato (50 mM, pH=5), incubados em temperatura ambiente por 40 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) 10%. Em seguida, todos os ensaios foram resfriados em banho de gelo por aproximadamente 10 minutos e centrifugados a 3000 rpm durante 10 minutos. A alteração colorimétrica pela reação de 0,5mL do sobrenadante da amostra preparada com 0,5 mL de KOH 5M foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 430 nm (zerado com o tampão acetato).

Uma unidade de atividade enzimática (IU) da protease corresponde à diferença de uma unidade de absorbância em 430 nm entre a amostra e o branco contendo a enzima desnaturada

por minuto de reação ($\Delta A/\text{minuto}$). A atividade enzimática foi definida de acordo com a equação 2:

$$(U/L) = (B-A)/40 \times 1000 \quad (2)$$

A- Valor da absorbância da amostra inativada

B- Valor da absorbância da amostra ativa

40 – Tempo da reação

1000 – Fator de correção de mL para L.

3.4 TAXONOMIA MOLECULAR

A identificação molecular do fungo filamentosso selecionado para o delineamento experimental foi realizada com base na análise de sequências do DNAr envolvendo a extração do DNA genômico, amplificação e sequenciamento parcial de regiões do *operon* ribossomal: região espaçadora ITS1-5,8S-ITS2. O PCR foi preparado em uma reação com 25 μL contendo: 5-25 ng de DNA genômico, 0,4 mM de cada primer, 0,2 U de dNTPs (GEHealthcare), 1,5 mM de MgCl_2 (Invitrogen), 2,0 U de Taq polymerase (Invitrogen) e 10 μL de tampão de reação (Invitrogen).

O programa de amplificação consistiu nos seguintes passos: desnaturação inicial a 94 °C por 2 min; 30 ciclos a 94 °C por 1 min; 55 °C por 1 min; e 72 °C por 3 min; com uma extensão final de 72 °C por 3 min. Os produtos de amplificação foram purificados utilizando mini-colunas (*GFX PCR DNA and gel band purification kit*, GE Healthcare) antes de serem submetidos ao sequenciamento em sequenciador automático (ABI 3500, Applied). Foram utilizados os primers ITS1 (5'-CCG TAG GTG AACCTG CGG-3') and ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (O'Donnell, 1993) para região ITS1-5.8S-ITS2. As sequências da região ITS1-ITS2 obtidas com cada primer foram montadas em um *contig* (sequência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) com ajuda do programa *phredPhrap* e comparadas com as sequências dessa mesma região do *operon* ribossomal de organismos representados na base de dados do Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Sequências de organismos relacionados à sequência do organismo alvo foram recuperadas do GenBank para realização das análises filogenéticas.

O alinhamento das sequências foi realizado utilizando o programa ClustalX e as análises filogenéticas e moleculares foram conduzidas utilizando o software MEGA versão 5.05 (Tamura et al., 2011), onde o modelo de Kimura 2-parâmetros (Kimura, 1980) foi utilizado para estimar a distância evolutiva com o valor de *bootstrap* calculado a partir de 1.000 replicatas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MANGANÊS PEROXIDASE, LIGNINA PEROXIDASE E GLIOXAL OXIDASE.

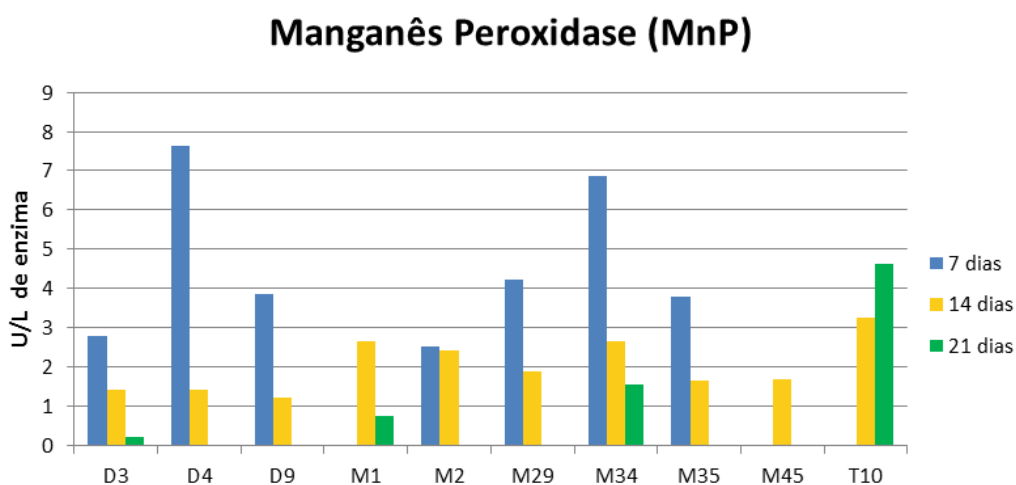
Para a determinação das atividades enzimáticas foram utilizados os valores apresentados no quadro abaixo, aplicados à equação 1.

Quadro 1. Parâmetros usados na fórmula derivados da metodologia utilizada.

	MnP	LiP	GLOX
ΔA – Diferença entre absorbância final e inicial	(B-A)	(B-A)	(B-A)
V – Volume da reação (em L)	0,001 (1mL)	0,0025 (2,5mL)	0,001 (1mL)
10^6 – Conversão de mols do ϵ em μmols	1.000.000	1.000.000	1.000.000
E – Coeficiente de extinção ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)	4.460	9.300	18.000
R – Quantidade de caldo enzimático (L)	0,0005 (0,5mL)	0,0005 (0,5mL)	0,00005 (50 μL)
T - Tempo de reação (min.)	5	10	10

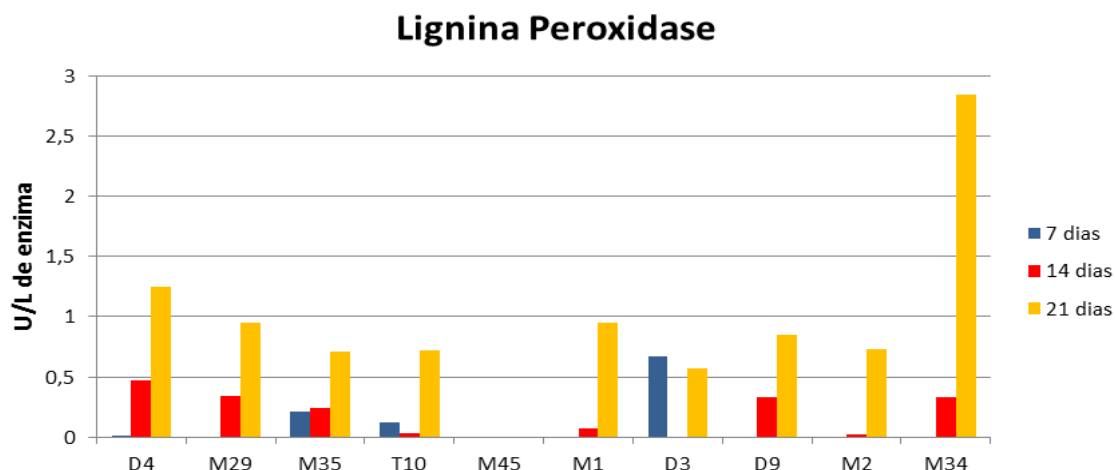
Os resultados obtidos para MnP mostram tendência para um aumento na produção dessa enzima no período até 7 dias, e posterior declínio como mostra a Figura 4. As linhagens D4 e M34 foram as melhores produtoras, produzindo 7,62 U/L e 6,86 U/L respectivamente.

Figura 4. Resultados da média das duplicatas obtidos para a enzima MnP.



A resposta enzimática para LiP aconteceu com maior expressividade no período do 21º dia, apresentando uma tendência nos resultados que varia de aproximadamente 0,5 à 1,0 U/L entre a maioria das linhagens analisadas, deferindo com D4 expressando 1,25 U/L, e o desvio padrão dos resultados expresso pela linhagem M34, que apresentou 2,83 U/L da enzima, como explícito na Figura 5.

Figura 5. Resultados da média das duplicatas obtidos para a enzima LiP.



Após análise combinada dos resultados de produção de LiP e MnP, os fungos D4 e M34 foram selecionados como os melhores produtores e submetidos a nova análise enzimática associada ao peso seco durante o período de cultivo (Figura 6). Os resultados demonstram uma tendência decrescente na atividade de MnP no decorrer do período experimental, enquanto que para LiP a tendência foi crescente. A MnP foi produzida em maior concentração, com picos em torno de 6 e 8 (U/L), em comparação aos picos de LiP que foram entre 1 e 3 (U/L). Em relação ao peso seco, tanto a linhagem D4 quanto a M34 apresentaram dados linearizados durante o tempo total de cultivo.

As análises realizadas para Glioxal Oxidase mostraram que entre todos os 10 fungos analisados (Figura 7), apenas a linhagem M45 não apresentou atividade enzimática. A tendência de pico aconteceu entre o 14º dia, com 50% das amostras apresentando atividade dentro desse período, confrontando os dados das enzimas ligninolíticas (MnP e LiP) que tiveram auges no 7º e 21º dia. Cabe ressaltar o “outlier” apresentado pela linhagem T10 no 7º dia, que apresenta pico de 72,77 U/L da enzima, e posteriormente não apresenta mais atividade.

Figura 6. Relação da produção enzimática para os melhores produtores de MnP e LiP em relação ao peso seco, analisados em 7, 14 e 21 dias.

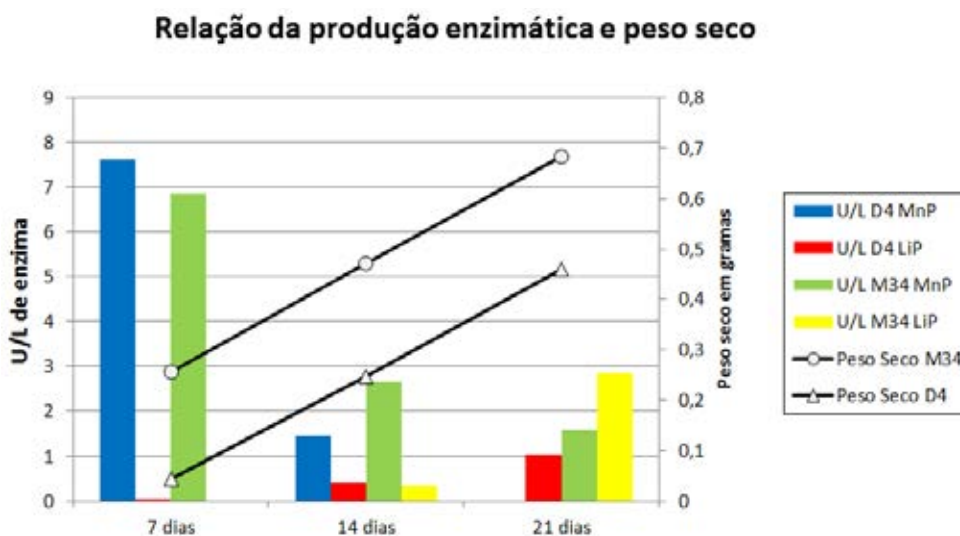
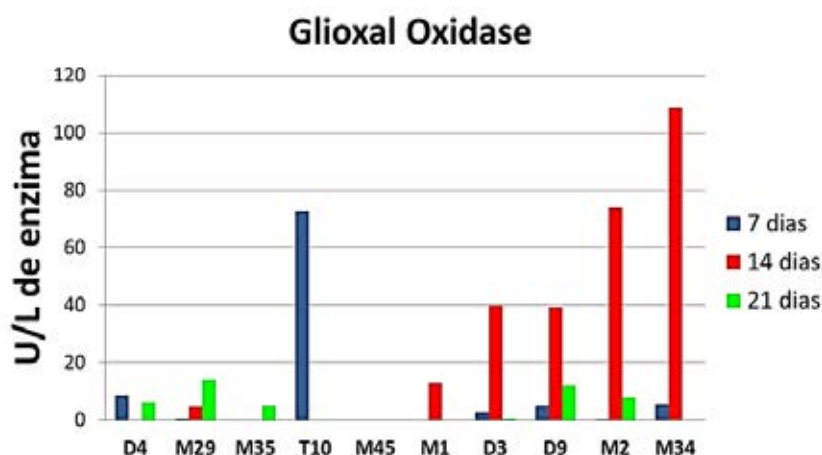


Figura 7. Resultados médios das duplicatas obtidas para a enzima GLOX.



A linhagem M34 apresentou maior atividade de GLOX, com pico em 108,88 U/L, seguida pela linhagem M2 (73,88 U/L), em 14 dias de cultivo. Os dados apresentados pela Figura 5, podem indicar o estreito vínculo entre a GLOX e LiP, pois sendo a GLOX uma enzima auxiliar das “Peroxidasas”, é de se esperar que o aumento na atividade da LiP seja resultante da maior disponibilidade de GLOX no meio de cultura. Por outro lado, a baixa expressividade da GLOX para a linhagem D4 contradiz a relação com a LiP.

Dentre as condições aplicadas no cultivo e triagem para as enzimas lignolíticas e GLOX, esta última apresentou maior atividade. Dentre as ligninolíticas, a MnP apresentou maiores atividades nas condições estudadas, sendo plausível sua aplicação em desenho experimental visando a otimização, uma vez que a triagem inicial destas enzimas foram realizadas com

meio de custo relativamente baixo (Malte 2% + 3% NaCl) e temperatura próxima à ambiental (28 °C), permitindo buscar variáveis que aumente a viabilidade produtiva para aplicações em escala industrial.

4.1.1 COMPARAÇÃO DE MEIO DE CULTURA PARA AS ENZIMAS LIGNOLÍTICAS

Considerando o ambiente natural das linhagens analisadas, foi realizada a comparação entre as condições de meio contendo malte/cloreto de sódio, e malte/água marinha artificial, aos quais os melhores produtores, as linhagens M34 e D4, foram cultivados. De acordo com os resultados mostrados nas Figura 8 e Tabela 1, pode observar que a linhagem M34 apresentou melhor rendimento para produção enzimática para MnP em 7 dias de cultivo em meio contendo Ma2% (3,35 U/L), e para LiP o pico de produtividade acontece em 7 dias com meio ASW (0,62 U/L), enquanto que a linhagem D4 apresentou melhores resultado com o meio ASW tanto para MnP em 21 dias (1,21U/L), quanto para LiP em 7 dias (0,86U/L).

Seguindo o padrão de produtividade enzimática, o resultado referente à MnP em 14 dias da linhagem M34 apresenta uma irregularidade não esperada para o mesmo, pois duas das três replicas não apresentaram atividade enzimática, entretanto, traçando um perfil linear entre os resultados, o valor esperado para a produção em 14 dias seria de 2,89 U/L. Perfil semelhante é apresentado para a linhagem D4 em meio ASW, onde o valor linearizado de MnP em 14 dias seria de 0,15 U/L.

Considerando os ensaios realizados para a triagem inicial e seleção dos melhores produtores das enzimas em questão, pode-se verificar que os valores máximos de produção enzimática para os novos meios propostos são bem inferiores aos valores obtidos anteriormente (Tabela 1), estabelecendo que o meio MA 2% + 3% NaCl confere as condições mais apropriadas, para a produção das enzimas ligninolíticas Manganês Peroxidase e Lignina Peroxidase, dentre os três meios analisados.

Figura 8. Resultados de produção de MnP e LiP em 7, 14 e 21 dias, em MA2% e água do mar artificial (ASW) + 2% de extrato de malte, pelas linhagens M34 e D4.

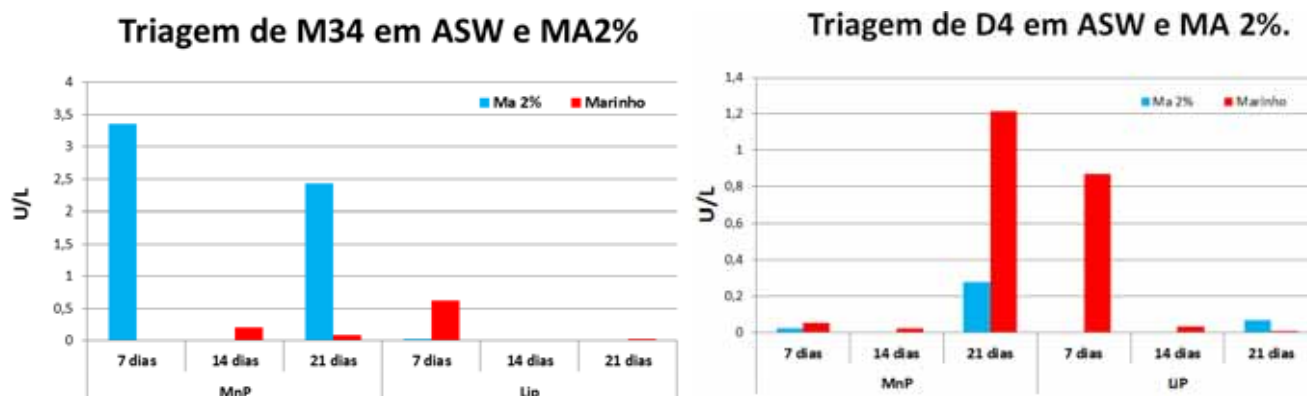


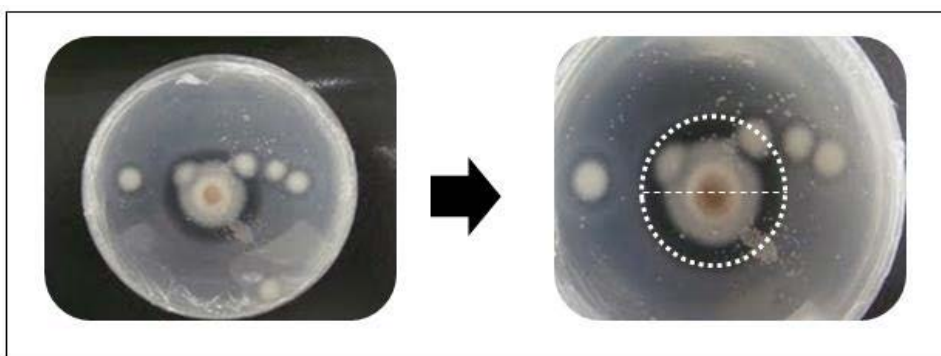
Tabela 1. Relação da atividade enzimática de MnP e LiP das linhagens M34 e D4, em MA2%, ASW, e MA2%+ 3%NaCl, após 7, 14 e 21dias.

		DIAS	D4	M34
MnP (U/L)	MA 2% + 3% NaCl	7	7,623	6,860
		14	1,424	2,645
		21	0,000	1,569
	ASW	7	0,049	0,000
		14	0,019	0,199
		21	1,215	0,079
	MA 2%	7	0,019	3,358
		14	0,000	0,009
		21	0,279	2,431
LiP (U/L)	MA 2% + 3% NaCl	7	0,000	0,000
		14	0,473	0,330
		21	1,247	2,838
	ASW	7	0,868	0,626
		14	0,031	0,000
		21	0,001	0,000
	MA 2%	7	0,000	0,028
		14	0,000	0,000
		21	0,067	0,000

4.2 PROTEASES

A triagem para as proteases foi aplicada às 98 linhagens de fungos filamentosos recuperados de amostras marinhas, sendo realizada em duas etapas, (1) triagem rápida em meio sólido por meio da produção de halo de degradação (Figura 9), e (2) atividade de protease em meio líquido analisada por espectrofotômetro e aplicados à equação 2.

Figura 9. Esquema de análise do halo (linhagem M36)



Foram considerados como proteolíticos para essa fase (Tabela 2), tanto as linhagens que apresentaram halo transparentes e bem delimitados, quanto os fungos com rápido crescimento vegetativo (hifas) após o período de 7 dias, o qual a impossibilidade de visualização do halo poderia conferir falsos negativos, e também os fungos com altos índices de esporulação, que apresentaram várias regiões de halo proveniente do crescimento dos esporos. Para conferir a importância da triagem em meio sólido Skim Milk (degradação das proteínas lácteas) vinculado à degradação de outras proteínas biotecnologicamente potenciais, foi incluído nos testes em meio líquido uma linhagem que não apresentou halo em Skim Milk, a D7, escolhida aleatoriamente.

Os halos mais representativos foram produzidos pelas linhagens M4 e M53 (esporulado), apresentando respectivamente 6,5 cm e 6,0 cm. Para a fase seguinte foram considerados os 35 positivos em meio sólido, sendo aplicados em meio líquido com dois pHs distintos (4,0 e 8,0).

Os resultados desta triagem demonstrou que, em geral, as proteases ácidas são produzidas em maior quantidade com máximas de 34,27 U/L para P13 e 24,00 U/L para M36, se comparada com as proteases alcalinas que apresentou máxima atividade de 4,58 U/L para T28, e 4,42 U/L para M38.

Como pode ser observada na Figura 10, a relação entre o crescimento do halo em meio sólido e as médias obtidas na após o crescimento em meio líquido não são dado

correlacionáveis, pelo menos para a linhagem D7, entretanto há uma tendência na qual os maiores valores de halo estão entre as maiores médias para as proteases ácidas, tornando aceitável que a mesma linhagem pode produzir níveis relevantes de distintas proteases. Tal discrepância nos dados pode estar relacionada com a fonte de nutriente oferecida no meio de cultura, sendo que em meio sólido Skim Milk, a principal fonte de nitrogênio é a Lactoalbumina entre outras proteínas presente no leite, já em meio sólido a fonte de proteína oferecida foi a Peptona, que é uma proteína semi-digerida. Essa diferença nos constituinte do meio sugere também o aparecimento da atividade positiva ($2,0 \times 10^{-6}$ U/L) para a linhagem D7, não sendo fator expressivo de desvio pela baixa produtividade apresentada pelo fungo analisado.

Em relação aos fungos com grande crescimento de hifas, dos quais não houve visualização do halo em 7 dias devido ao cobrimento total da placa, os dados obtidos são relevantes perante às máximas para as proteases ácidas, com valores de 11,31 U/L para M2 e 5,27 U/L para P12, confirmando a importância da inclusão destas linhagens na análise em meio líquido.

Figura 10. Resultados da produção de proteases obtidos através da média das duplicatas em pH 4 e pH 8 em (Barras) e o halo (cm).

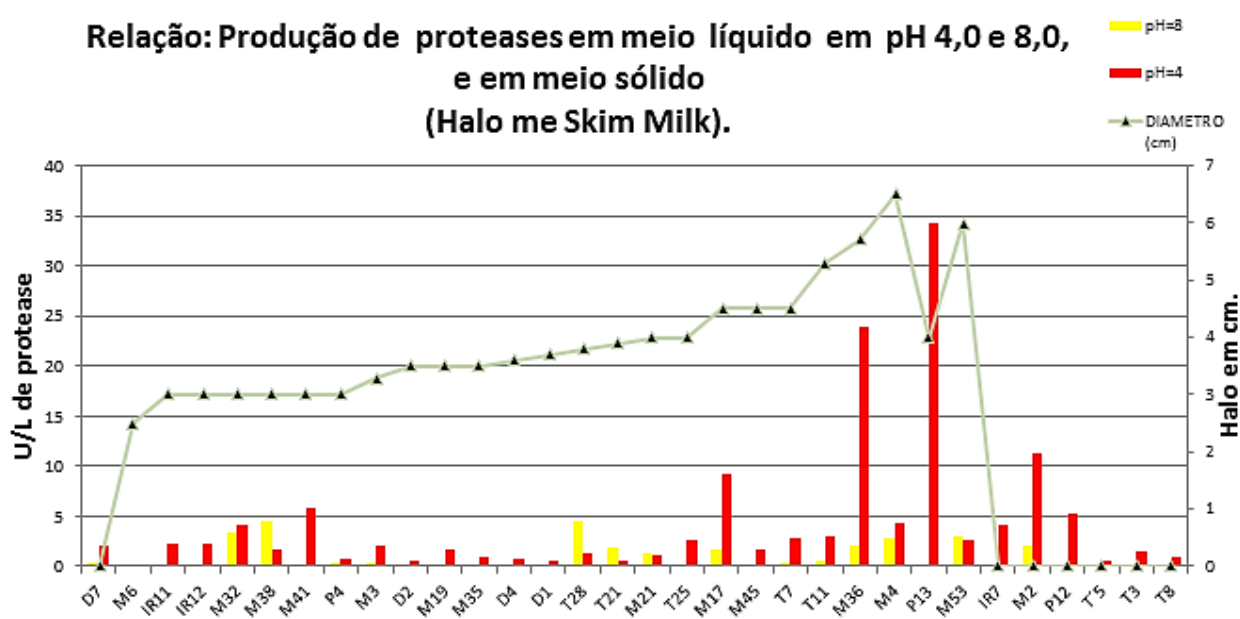


Tabela 2. Diâmetro do halo de degradação em centímetros após 7 dias.

ID	Halo (cm)	ID	Halo (cm)
D1	3,7	M42	5
D2	3,5	M45	4,5
D4	3,6	M6	2,5
IR11	3	P4	3
IR12	3	T11	5,3
IR9	3,5	T21	3,9
M1	4,3	T25	4
M11	4,5	T28	3,8
M17	4,5	T7	4,5
M19	3,5	M53	6,0 ESPORULADO
M21	4	P13	4,0 ESPORULADO
M3	3,3	----	-----
M32	3	T8	T
M36	5,7	IR7	T
M37	3,5	M2	T
M38	3	P12	T
M4	6,5	T'5	T
M41	3	T3	T

T = (total) crescimento rápido das hifas, dificultando a visualização do halo no período estipulado.

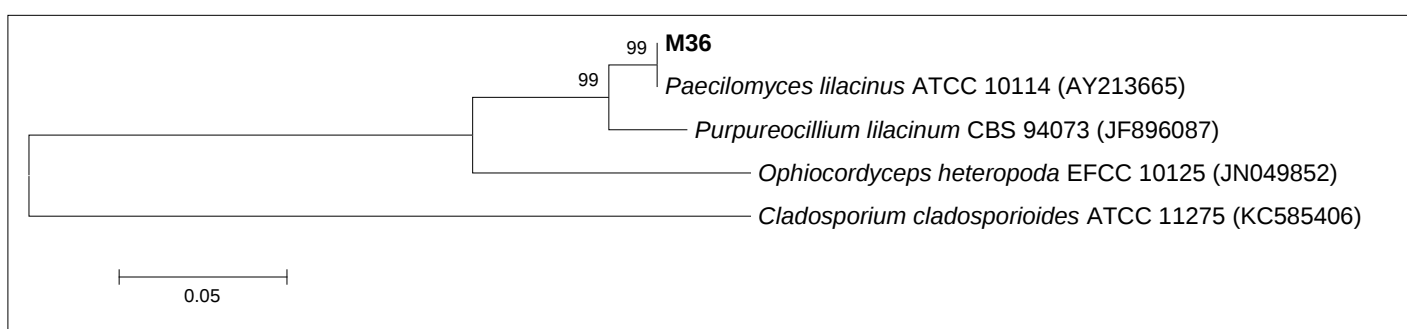
4.2.1 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DA LINHAGEM M36

De acordo com os dados apresentados na Figura 10, a linhagem M36 apresentou maior halo proteolítico (5,7cm) e foi também a segunda maior produtora de prpotease em meio líquido (24U/L). Tais resultados, em adição a uma contaminação irreversível da linhagem P13 melhor produtora em meio líquido, favoreceram a escolha do fungo M36 para o processo de otimização e certificação da espécie selecionada.

A identificação da linhagem escolhida através de sequenciamento foi de grande importância para amparar as condições iniciais adequadas do processo de otimização já relatadas na literatura, dando encaminhamento para os constituintes do meio e das condições de cultivos, diminuindo os gastos com insumos em testes extras.

O micro-organismo sequenciado apresentou 100% de similaridade com *Paecilomyces lilacinus* ATCC 10114 (AY213665), como demonstrado na árvore filogenética apresentada na Figura 11. Este resultado motivou ainda mais a continuação dos testes, pois em estudos realizados em 2013 por Cavello et al., tal espécie apresentou uma nova atividade de queratinase após fermentação em meio líquido em estudos de bioconversão de resíduos de queratina. Assim, o fungo marinho *Paecilomyces lilacinus* (M36) foi selecionado para as atividades subsequentes relacionadas ao processo de otimização da enzima protease.

Figura 11. Árvore filogenética correlacionando as espécies com maior semelhança com a linhagem M36.



4.2.2 PARÂMETROS PARA OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO PARA PROTEASE

Como já demonstrado com a triagem das proteases ácidas e alcalinas na Figura 10, a escolha da cobertura de pH aplicada ao desenho experimental deve variar em condições ácidas, devido a produtividade de proteases pela linhagem M36 ser maior nesta faixa. A

temperatura, devido a uma questão logística do laboratório, foi mantida em 28°C durante todo o processo, assim como agitação do meio de cultivo em 140 rpm. A quantidade de inóculo foi estipulada pela base de 2 cilindros utilizado na triagem inicial, com o intuito de avaliar o efeito em concentrações de até 5 cilindros de inóculo por 50 mL de meio.

As condições nutricionais foram selecionadas a partir de estudos prévios, tais como os relatados por Radha et al. (2011), Narayana et al. (2008), e Shaheen et al. (2008), que afirmam que as fontes orgânicas de nitrogênio apresentaram melhores resultados para a produção de proteases ácidas, sendo assim, ficou a critério do custo-benefício para a utilização de caseína, extrato de carne, peptona e/ou extrato de soja. Radha et al. (2011) ressaltam a importância da aplicação de farinha de cereais no meio de cultura, pois em seu trabalho tanto a farinha de milho quanto a de arroz mostraram significativo incremento na atividade de protease, sendo a farinha de milho mais eficaz com aumento de aproximadamente 1% de comparada ao controle. Para a padronização e reprodutibilidade do processo descrito neste projeto, a Figura 12 mostra as características (marcas) das fontes de nitrogênio e das farinhas utilizadas. Em contrapartida, as fontes de carbono malte e amido foram selecionadas pela disponibilidade destes itens dentre os componentes padrões do laboratório.

Figura 12. Especificações sobre a Farinha de aveia, Farinha de milho, Farinha de arroz e Extrato de soja utilizado no processo de otimização do *Paecilomyces lilacinus* M36.



Fonte: fotos do autor.

5 DESENHO EXPERIMENTAL

5.1 PLACKETT-BURMAN (P&B)

O processo de otimização teve início com um modelo P&B. Para a elaboração do primeiro teste (P&B) do processo de otimização da produção de proteases, foi estabelecido a aplicação de 12 variáveis escolhidas através dos critérios descritos na sessão 4.2.2, e ordenadas na tabela 3, especificadas em três níveis : (-1), central (0) , e (+1), permitindo a avaliar os efeitos destas variáveis e o caminho a ser seguido ao final de cada etapa.

Tabela 3. Variáveis e as correspondentes faixas aplicadas ao primeiro P&B para a produção de protease por *Paecilomyces lilacinus*.

Variáveis	-1	0	+1
1. N° de cilindros do inoculo	3	4	5
2. Glicose (g/L)	0	0,2% (0,10 g/50 ml)	0,4% (0,20 g/50 ml)
3. Amido (g/L)	0	0,2% (0,10 g/50 ml)	0,4% (0,20 g/50 ml)
4. Extrato de Malte (g/L)	0	0,4% (0,20 g/50 ml)	0,8% (0,40 g/50 ml)
5. Extrato de soja (g/L)	0	0,1% (0,05 g/50 ml)	0,2% (0,10 g/50 ml)
6. Peptona (g/L)	0	0,1% (0,05 g/50 ml)	0,2% (0,10 g/50 ml)
7. Caseína (g/L)	0	0,1% (0,05 g/50 ml)	0,2% (0,10 g/50 ml)
8. Farinha arroz (g/L)	0	1% (0,50 g/50 mL)	2% (1,0g /50 mL)
9. Farinha milho (g/L)	0	1% (0,50 g/50 mL)	2% (1,0g /50 mL)
10. Farinha aveia (g/L)	0	1% (0,50 g/50 mL)	2% (1,0g /50 mL)
11. ASW (ml)	0 (0%)	25 ml (50%)	50 ml (100%)
12. pH	3,0	4,0	5,0

A elaboração do desenho experimental com base na Matriz Codificada para 12 variáveis do P&B forneceu a base para a formulação dos 19 diferentes ensaios e condições descritos na Tabela 4, com as quantidades determinadas para 50 mL de meio de cultura.

De acordo com as análises estatísticas (Tabela 5.), a única variável com P-valor estatisticamente aceito (considerando, por se tratar de um sistema biológico, como faixa de aceitação as variáveis com $p < 0,1$.) foi a água do mar artificial (ASW), com efeito positivo de 5,7 U/L e em um patamar mais brando estatisticamente o extrato de malte, com efeito positivo de 4,10 U/L. Dentro dos limites da análise, é possível observar que algumas variáveis, mesmo não apresentando representatividade estatística, interferiram negativamente na resposta, podendo ser eliminadas para a próxima fase do processo. Tais variáveis são: a quantidade do inóculo, caseína, farinha de milho, e a faixa de pH.

Tabela 4. Matriz das amostras aplicada para a elaboração das amostras elaborada a partir da Matriz Codificada Plackett- Burman para 12 variáveis + 3 pontos centrais, com valores referentes à 50mL de meio.

	Nº de cilindros do inoculo	Glicose (g/L)	Amido (g/L)	Ext. Malte (g/L)	Farinha de soja (g/L)	Peptona (g/L)	Caseína (g/L)	Farinha arroz (g/L)	Farinha milho (g/L)	Farinha aveia (g/L)	ASW (ml)	pH
1	5	0	0	0	0,10 g	0	0	1,0g	1,0g	0	1,0g	3
2	5	0,20 g	0	0	0	0,10 g	0	0	1,0g	1,0g	0	5
3	5	0,20 g	0,20 g	0	0	0	0,10 g	0	0	1,0g	1,0g	3
4	5	0,20 g	0,20 g	0,40 g	0	0	0	1,0g	0	0	1,0g	5
5	3	0,20 g	0,20 g	0,40 g	0,10 g	0	0	0	1,0g	0	0	5
6	5	0	0,20 g	0,40 g	0,10 g	0,10 g	0	0	0	1,0g	0	3
7	3	0,20 g	0	0,40 g	0,10 g	0,10 g	0,10 g	0	0	0	1,0g	3
8	5	0	0,20 g	0	0,10 g	0,10 g	0,10 g	1,0g	0	0	0	5
9	5	0,20 g	0	0,40 g	0	0,10 g	0,10 g	1,0g	1,0g	0	0	3
10	3	0,20 g	0,20 g	0	0,10 g	0	0,10 g	1,0g	1,0g	1,0g	0	3
11	3	0	0,20 g	0,40 g	0	0,10 g	0	1,0g	1,0g	1,0g	1,0g	3
12	5	0	0	0,40 g	0,10 g	0	0,10 g	0	1,0g	1,0g	1,0g	5
13	3	0,20 g	0	0	0,10 g	0,10 g	0,10 g	1,0g	0	1,0g	1,0g	5
14	3	0	0,20 g	0	0	0,10 g	0,10 g	0	1,0g	0	1,0g	5
15	3	0	0	0,40 g	0	0	0,10 g	1,0g	0	1,0g	0	5
16	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
17 (C)	4	0,10 g	0,10 g	0,20 g	0,05 g	0,05 g	0,05 g	0,50 g	0,50 g	0,50 g	0,50 g	4
18 (C)	4	0,10 g	0,10 g	0,20 g	0,05 g	0,05 g	0,05 g	0,50 g	0,50 g	0,50 g	0,50 g	4
19 (C)	4	0,10 g	0,10 g	0,20 g	0,05 g	0,05 g	0,05 g	0,50 g	0,50 g	0,50 g	0,50 g	4

Os resultados da atividade enzimática desta primeira etapa do desenho experimental (Figura 13) possibilitou o levantamento dos efeitos de cada variável dentre as amostras (Tabela 5), com pico de produtividade média de 16,64 U/L referente aos ensaios 7, 11, 16, 17 e 18.

Figura 13. Resultados obtidos com o 1º P&B.

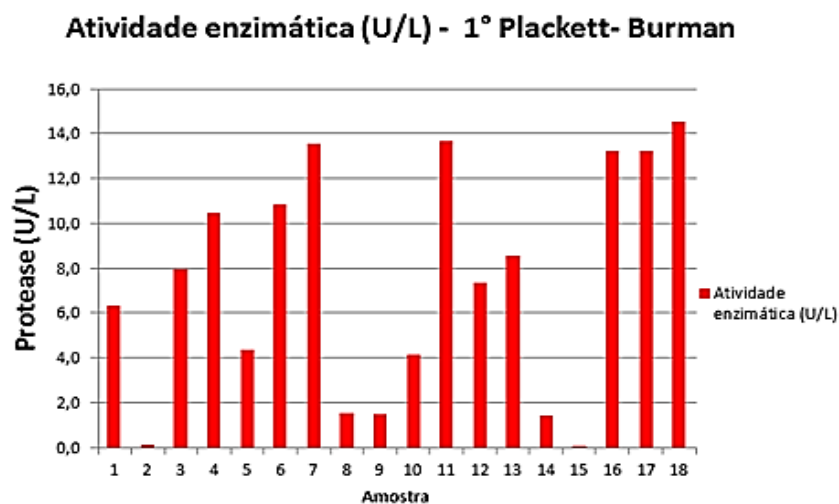


Tabela 5. Análise estatística do delineamento de Plackett-Burman obtido com software STATISTICA 7.0 sobre o efeito das 12 variáveis.

Variáveis	Efeito	Erro Padrão	P (Valor)
(1) Inoculo	-0,10729	2,611249	0,968559
(2) Glicose	1,04271	2,611249	0,703487
(3) Amido	1,97396	2,611249	0,478301
(4) Malte	4,10521	2,611249	0,166981
(5) Extrato de soja	2,53854	2,611249	0,368517
(6) Peptona	1,17813	2,611249	0,667713
(7) Caseína	-1,96771	2,611249	0,479635
(8) Farinha arroz	0,18854	2,611249	0,944787
(9) Farinha milho	-1,89271	2,611249	0,49584
(10) Farinha aveia	1,83021	2,611249	0,509624
(11) ASW	5,70313	2,611249	0,071659
(12) pH	-2,88437	2,611249	0,311651

Devido à baixa representatividade estatística dos efeitos apresentados e o alto custo do extrato de soja e glicose, tais componentes foram suspensos do segundo P&B. Sendo composto de amido, extrato de malte, peptona, farinha de arroz, farinha de aveia, água do mar artificial, e a faixa de pH alterada (Tabela 6), o segundo P&B foi desenvolvido de maneira semelhante ao primeiro com os testes elaborados através de uma matriz codificada, agora com 7 variáveis e 3 pontos centrais, variações de meio de cultivo para a formulação das 11 amostras (Tabela 7).

Tabela 6. Variáveis e as correspondentes faixas aplicadas ao segundo P&B para a produção de protease *Paecilomyces lilacinus*.

Variáveis	-1	0	1
(1) Amido (g/L)	0	0,4% (0,20 g/50 ml)	0,8% (0,40g/50 mL)
(2) Extrato de Malte (g/L)	0	0,8% (0,40 g/50 ml)	1,6% (0,80g/50 mL)
(3) Peptona (g/L)	0	0,2% (0,10 g/50 ml)	0,4% (0,20 g/50 ml)
(4) Farinha arroz (g/L)	0	2% (1,0g /50 mL)	4% (2,0g/50 mL)
(5) Farinha aveia (g/L)	0	2% (1,0g /50 mL)	4% (2,0g/50 mL)
(6) ASW (ml)	0 (0%)	25 ml (50%)	50 ml (100%)
(7) pH	2	3	4

Tabela 7. Matriz com valores reais aplicada para a elaboração dos ensaios do segundo P&B (7 variáveis + 3 pontos centrais), com valores referentes à 50mL de meio.

	1-Amido	2-Ext. Malte	3-Peptona	4-Farinha de Arroz	5-Farinha de Aveia	6-ASW	7-pH
1	0,40g	0g	0g	2,0g	0g	50 mL	4
2	0,40g	0,80g	0g	0g	2,0g	0 mL	4
3	0,40g	0,80g	0,20g	0g	0g	50 mL	2
4	0g	0,80g	0,20g	2,0g	0g	0 mL	4
5	0,40g	0g	0,20g	2,0g	2,0g	0 mL	2
6	0g	0,80g	0g	2,0g	2,0g	50 mL	2
7	0g	0g	0,20g	0g	2,0g	50 mL	4
8	0g	0g	0g	0g	0g	0 mL	2
9 (C)	0,20g	0,40g	0,10g	1,0g	1,0g	25 mL	3
10 (C)	0,20g	0,40g	0,10g	1,0g	1,0g	25 mL	3
11 (C)	0,20g	0,40g	0,10g	1,0g	1,0g	25 mL	3

Como observado na Figura 14, a resposta para tal conjunto de variáveis proposta neste segundo P&B foi menor, com máxima de 10,93 U/L da enzima, indicando que o desenho experimental não está satisfazendo as condições otimizadas para a produção das proteases, exigindo um novo perfil para o andamento do planejamento aplicado.

Embora a produção enzimática sendo menor que o teste precedente, a análise estatística (Tabela 8) foi aplicada com o intuito extrair, com respaldo matemático, a contribuição de cada componente do meio para a diminuição da resposta. Neste *feedback*, o P-valor de todas as variáveis ficaram acima da faixa aceitável, com o Extrato de malte (P-valor de 0,11) apresentando efeito positivo de 3,89 U/L, e para a Farinha de arroz (P-valor de 0,10) o efeito negativo de 4,05 U/L.

Figura 14. Resultados da atividade enzimática obtidos com o 2º P&B.

Atividade enzimática (U/L) - 2º Plackett Burman

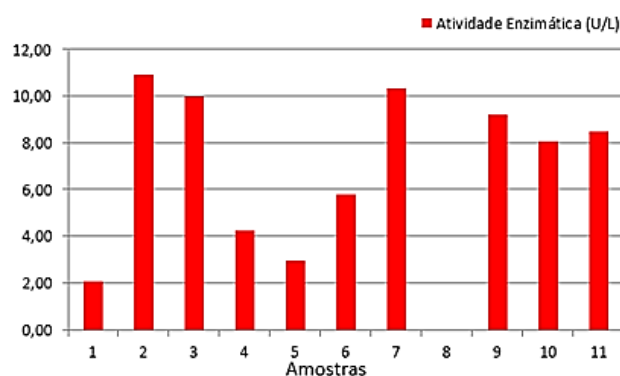


Tabela 8. Análise estatística do delineamento de Plackett-Burman obtido com software STATISTICA 7.0 sobre o efeito das 7 variáveis.

Variáveis	Efeito	Erro Padrão	P (Valor)
(1) Amido	1,37083	1,731364	0,486326
(2) Extrato de malte	3,89583	1,731364	0,109923
(2) Peptona	2,17917	1,731364	0,297196
(4) Farinha arroz	-4,05417	1,731364	0,101074
(5) Farinha aveia	3,4375	1,731364	0,14131
(6) ASW	2,52083	1,731364	0,24142
(7) pH	2,22917	1,731364	0,288247

Devido ao desvio negativo apresentado pela dinâmica dos dois P&B aqui apresentados, e a baixa produtividade quando comparado à triagem inicial de 24 U/L (Figura 10), ficou estabelecida a necessidade de testar os fatores já relatados neste projeto, a partir de uma triagem secundária ao desenho experimental contendo três potenciais formulações base: meio de saís descrito por Savitha et al. (2007) nas condições descritas na sessão 3.2 para a protease (acrescido de 10 g/L de peptona bacteriológica quando formulado na ausência de outros constituintes) usado para a triagem inicial em meio líquido, a água do mar artificial pelas características marinhas do ambiente natural do micro-organismo analisado, e o meio “A” referente à composição da 11ª amostra analisada no 1º P&B mostrado na Tabela 9, aplicado neste teste para estimular a melhor produtividade enzimática se comparada às outras formulações dos P&Bs. Para satisfazer o intuito deste teste paralelo, os três meios básicos aqui atribuídos foram correlacionados como mostra a Tabela 10, e testados nas mesmas condições de 28°C, 140 rpm, durante o período de 7 dias, semelhante aos outros testes aplicados para a protease. Os resultados mostram que a duplicata referente ao meio mineral Savitha com peptona apresentou maior sucesso com a produção enzimática com atividade média de 25,46 U/L, tornando o meio base para as próximas etapas do processo de otimização.

Tabela 9. Conformação das condições de cultura referente à amostra 11 do primeiro P&B.

A	0,2 g Glicose 0,4 g extrato de malte 0,1 g farinha de soja 0,1 g peptona 0,1 g caseína pH = 3
----------	--

Tabela 10. Correlação dos meios A, ASW e SAVITHA, e resultados em U/L da atividade enzimática da cepa M36 (*Paecilomyces lilacinus*).

Amostra	Atividade Enzimática	Média da Atividade Enzimática	Meio de cultura
1	20,98	19,75	A + AWS + SAVITHA
2	18,52		
3	15,9	14,58	A + SAVITHA
4	13,26		
5	13,19	13,62	A + AWS
6	14,04		
7	22,83	24,28	A
8	25,73		
9	25,18	25,46	SAVITHA + Peptona
10	25,74		

5.2 FATORIAL FRACIONADO

Contando com a base dos testes anteriores, a partir da aplicação do modelo Fatorial Fracionado, todas as amostras apresentarão como meio base a formulação descrita por Savitha et al. (2007), e de acordo com relatos de Mussarat Shaheen et al. (2008), a caseína e derivados da soja são cientificamente comprovados como melhores fontes de nitrogênio para a produção de proteases microbiológicas, dando o respaldo científico para “re-adoção” da caseína e do extrato de soja, desligados do desenho experimental a partir das análises dos primeiros P&B.

Para a elaboração de delineamento fatorial fracionado, foi utilizado a Matriz com os valores reais (Tabela 12) construída a partir da Matriz Codificada Fatorial Fracionado 2^{5-1} ($2^4 \rightarrow 16$ ensaios + 3 pontos centrais = 19 ensaios) para a avaliação de 5 variáveis apresentadas na Tabela 11 com as respectivas faixas aplicadas.

Os resultados da obtidos com o primeiro delineamento fatorial fracionado retomou o valor inicial de produtividade, com pico em 24,47 U/L (Figura 15), mostrando que as variáveis suplementadas com a composição de realmente favorecem a produtividade enzimática de protease.

A análise dos dados da Figura 15 e dos efeitos obtida através do software (Tabela 13) evidencia o efeito negativo do extrato de malte aplicado nos teste deste primeiro conjunto fatorial fracionado, pois como é possível observar, as amostras com os maiores valores de produtividade enzimática 7, 11, 13, e 15 que expressam respectivamente 22,45 U/L, 22,17 U/L, 24,47 U/L e 24,46 U/L, não apresentavam este componente em sua composição. Em adição, os ensaios composto pelo nível (+1) de 1,6g de extrato de malte (amostras 2, 4, 6, 8, 10, 12, e 14) apresentaram os menores valores desta etapa, e conferindo respaldo estatístico para a análise, o extrato de malte apresentou no conjunto dos ensaios um efeito negativo de 12,64 U/L com P-valor estatisticamente relevante, ficando evidente a sua extinção para os

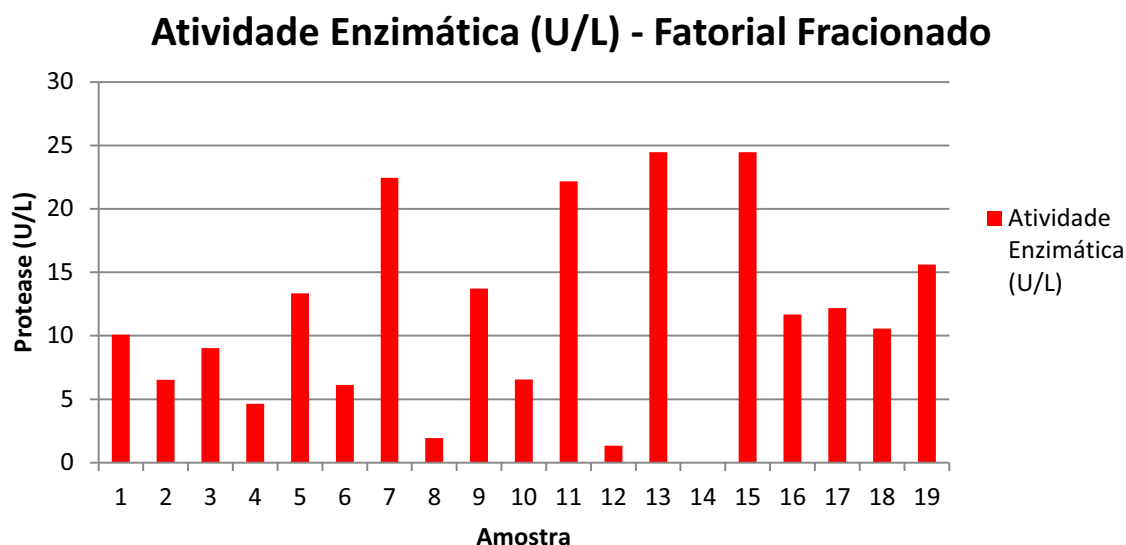
próximos testes. Para os valores de pH dos melhores resultados apresentados, somente o ensaio 15 mostrou relevância na faixa mais ácida (pH 3,0), com efeito estatístico positivo de 4,75 U/L e p-valor de 0,03, orientando a expansão da faixa com tendência ao meio neutro. A caseína e o extrato de soja, ficando em segundo plano com seus p-valores declarados entre 0,05 e 0,1 (faixa ainda aceita para modelos biológicos), apresentaram dinâmicas estatisticamente semelhantes, com efeito positivo de 3,7 U/L e p-valor de 0,07, anunciando a possibilidade de aumento na produtividade enzimática quando em maiores quantidades.

Tabela 11. Apresentação das 5 variáveis e as correspondentes faixas aplicadas ao modelo Fatorial Fracionado do desenho experimental para a produção de protease de *Paecilomyces lilacinus*.

Variáveis	-1	0	+1
(1) Extrato de Malte (g/L)	0	1,6% (0,80 g/50 ml)	3,2% (1,6 g/50 ml)
(2) Peptona (g/L)	0	0,1% (0,05 g/50 ml)	0,2% (0,10 g/50 ml)
(3) Caseína	0	0,1% (0,05 g/50 ml)	0,2% (0,10 g/50 ml)
(4) Extrato de soja (g/L)	0	1% (0,5 g /50 mL)	2% (1,0g /50 mL)
(5) pH	3,0	4,0	5,0

Tabela 12. Matriz das amostras aplicada para a elaboração das amostras elaborada a partir da Matriz Codificada Fatorial Fracionado 2^{5-1} (= 24 → 16 ensaios + 3 pontos centrais = 19 ensaios), com valores referentes à 50mL de meio.

Delineamento Fracionado 2^{5-1}					
ENSAIOS	Extrato de malte	Peptona	Caseína	Extrato de soja	pH
1	0g	0g	0g	0g	5
2	1,6g	0g	0g	0g	3
3	0g	0,1g	0g	0g	3
4	1,6g	0,1g	0g	0g	5
5	0g	0g	0,1g	0g	3
6	1,6g	0g	0,1g	0g	5
7	0g	0,1g	0,1g	0g	5
8	1,6g	0,1g	0,1g	0g	3
9	0g	0g	0g	1,0g	3
10	1,6g	0g	0g	1,0g	5
11	0g	0,1g	0g	1,0g	5
12	1,6g	0,1g	0g	1,0g	3
13	0g	0g	0,1g	1,0g	5
14	1,6g	0g	0,1g	1,0g	3
15	0g	0,1g	0,1g	1,0g	3
16	1,6g	0,1g	0,1g	1,0g	5

Figura 15. Resultados da atividade enzimática obtidos com o 1º fatorial fracionado.**Tabela 13.** Análise estatística do delineamento de Plackett-Burman obtido com software STATISTICA 7.0 sobre o efeito das 5 variáveis aplicadas ao 1º fatorial fracionado.

Variáveis	Efeito	Erro Padrão	P (Valor)
(1) Extrato de malte	-12,6418	1,960082	0,000022
(2) Peptona	2,129	1,960082	0,29713
(3) Caseína	3,7792	1,960082	0,075972
(4) Extrato de soja	3,7625	1,960082	0,07713
(5) pH	4,748	1,960082	0,030769

A elaboração do segundo delineamento fatorial fracionado contendo 4 variáveis, com base na Matriz codificada Fatorial Fracionado 2^{4-1} ($= 2^3$) + 3 pontos centrais, para a elaboração das 11 amostras tendo o meio mineral de Savitha como base para todos os ensaios, foi estabelecida a exclusão do extrato de malte devido ao seu efeito extremamente negativo no ensaio anterior, a manutenção da faixa de peptona na expectativa de aumentar a representatividade do p-valor e dos seus efeitos neste teste, e o aumento na amplitude das faixas aplicadas para a caseína, extrato de soja e pH (Tabela 14), comparado ao teste anterior buscando aumentar seus efeitos positivos perante a produtividade proteolítica. A matriz com os valores codificados está apresentada na Tabela 15.

Tabela 14. Variáveis e as correspondentes faixas aplicadas ao segundo Fatorial Fracionado para a produção de protease por *Paecilomyces lilacinus*.

Variáveis	-1	0	+1
(1) Peptona (g/L)	0	0,1% (0,05 g/50 ml)	0,2% (0,10 g/50 ml)
(2) Caseína	0,2% (0,01 g/50 ml)	0,3% (0,15 g/50 ml)	0,4% (0,20 g/50 ml)
(3) Extrato de soja (g/L)	2% (1,0 g/50 ml)	3% (1,5 g /50 mL)	40% (2,0g /50 mL)
(4) pH	3,0	5,0	7,0

Tabela 15. Matriz das amostras aplicada para a elaboração das amostras elaborada a partir da Matriz Codificada Plackett- Burman para 4 variáveis + 3 pontos centrais, com valores referentes à 50mL de meio.

ENSAIOS	Peptona	Caseína	Extrato de soja	pH
1	0g	0,01g	1g	3
2	0,1g	0,01g	1g	7
3	0g	0,2g	1g	7
4	0,1g	0,2g	1g	3
5	0g	0,01g	2g	7
6	0,1g	0,01g	2g	3
7	0g	0,2g	2g	3
8	0,1g	0,2g	2g	7
9	0,05g	0,15g	1,5g	5
10	0,05g	0,15g	1,5g	5
11	0,05g	0,15g	1,5g	5

Neste segundo fatorial fracionado foi aplicado paralelamente, também com bases na Matriz Codificada Fatorial Fracionado 2^{4-1} ($= 2^3$) + 3 pontos centrais uma certificação da atuação da farinha de aveia, para efeito de comparação com a ação do extrato de soja, conferindo um complemento para a tomada de decisão em relação às variáveis para os próximos testes. A formulação das 11 amostras seguiu o mesmo padrão dos testes com o extrato de soja, como mostrado na tabela 16.

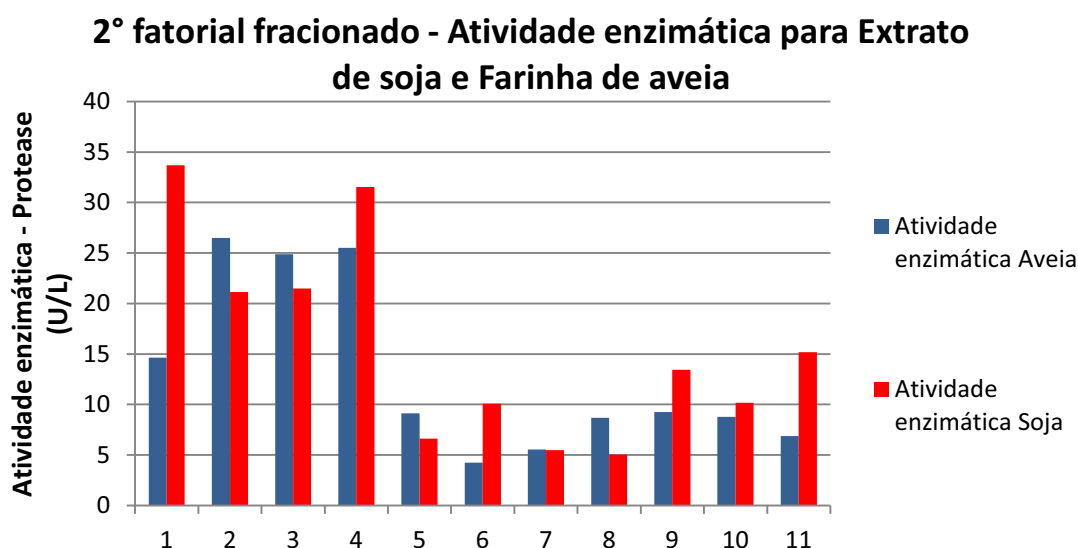
Os resultados apresentados na Figura 16, mostram claramente que a utilização do extrato de soja foi 54,5% (6 em 11) mais eficiente no efeito da produtividade enzimática quando comparado aos meios contendo farinha de aveia, com picos expressivos na amostra 1 com 33,68 U/L, e amostra 4 com 31,53 U/L. Também é possível analisar que as máximas atividades enzimáticas atingidas pelas composições com farinha de aveia apresentam média de 25,63 U/L (amostras 2, 3, e 4), que não distanciam do valor atingido nos teste iniciais de triagem da enzima (24U/L, Figura 6). Desta forma, fica estabelecido que o extrato de soja,

aplicado nas condições descritas neste segundo delineamento fatorial fracionado é melhor indutor de proteases.

Tabela 16. Matriz das amostras aplicada para a elaboração das amostras elaborada a partir da Matriz Codificada Plackett- Burman para 4 variáveis + 3 pontos centrais, com valores referentes à 50mL de meio, com substituição do extrato de soja, pela farinha de aveia.

ENSAIOS	Peptona	Caseína	Farinha de aveia	pH
1	0g	0,01g	1g	3
2	0,1g	0,01g	1g	7
3	0g	0,2g	1g	7
4	0,1g	0,2g	1g	3
5	0g	0,01g	2g	7
6	0,1g	0,01g	2g	3
7	0g	0,2g	2g	3
8	0,1g	0,2g	2g	7
9	0,05g	0,15g	1,5g	5
10	0,05g	0,15g	1,5g	5
11	0,05g	0,15g	1,5g	5

Figura 16. Resultados para comparação da influência na utilização de extrato de soja e farinha de aveia para desenho fatorial fracionado com delineamento $2^{4-1} (= 2^3) + 3$ pontos centrais para a certificação do melhor componente para o processo de otimização.



A certificação da atividade proteica com o componente do meio de cultura deve-se ao conteúdo proteico nutricional do mesmo, sendo assim, de acordo com a citação feita por Vieira et al. (1991) as frações de proteína e óleo da soja compreendem aproximadamente 60% do total do peso seco da semente, matéria-prima base para os derivados como o extrato de soja,

no qual os grãos maduros contêm cerca de 40,7% de proteína, taxa proteica cerca de duas vezes superior quando comparado com o valor proteico da aveia (Milach et al. 2000). Além da contribuição proteica, a soja ainda apresenta cerca de 22,7% de óleo e 30,8% de carboidratos, em base seca dos grãos maduros, nutrientes que podem favorecer o processo de produção enzimática em conjunto com os minerais da composição Savitha.

Pela representatividade do extrato de soja, a investigação estatística através do software foi realizada somente com os dados referentes ao delineamento com tal componente em sua composição (Tabela 17). As variáveis significativamente aceitáveis de acordo com o P-valor menor que 0,05 foram o extrato de soja e o pH. Os resultados afirmam que o efeito do pH aplicado neste delineamento, com p-valor de 0,058, contribuiu negativamente em 6,625 U/L da enzima, dando o parecer da necessidade de alterações na faixa para obtenção de melhores resultados, contudo, o extrato de soja com p-valor de $3,9 \cdot 10^{-4}$ (indicando uma ótima aceitação estatística para o efeito) apresentou efeito positivo de 20,15U/L da enzima, confirmando a relevância deste componente para a elaboração do meio de cultura otimizado.

Tabela 17. Análise estatística obtida com software STATISTICA 7.0 sobre o efeito das 4 variáveis do segundo fatorial fracionado composto com Extrato de soja.

Variáveis	Efeito	Erro Padrão	P (Valor)
(1)Peptona	0,1292	2,840892	0,965211
(2)Caseína	-2	2,840892	0,507818
(3)Extrato de soja	20,1542	2,840892	0,000394
(4)pH	-6,625	2,840892	0,058479

5.3 DELINEAMENTOS COMPOSTO CENTRAL ROTACIONAL (DCCR)

Partindo para o delineamento composto central rotacional, utilizando as informações e o direcionamento fundamentado nas outras etapas do desenho experimental, ficou estabelecido a análise das três variáveis mais relevantes do ponto de vista produtivo, com a diminuição da faixa aplicada de extrato de soja, pois os dados da Figura 16 indicam que o efeito positivo deste componente é diretamente oposto à quantidade, quando analisado nos perímetros entre 1,0 e 2,0 g. A resposta negativa do pH observada no teste anterior foi mantida devido à presença dos níveis adicionais presente no DCCR, permitindo uma melhor percepção dos efeitos desta variável, não desviando da faixa das proteases ácidas focadas desde a triagem inicial. A manutenção da caseína nos testes deve-se ao valor agregado presente na peptona

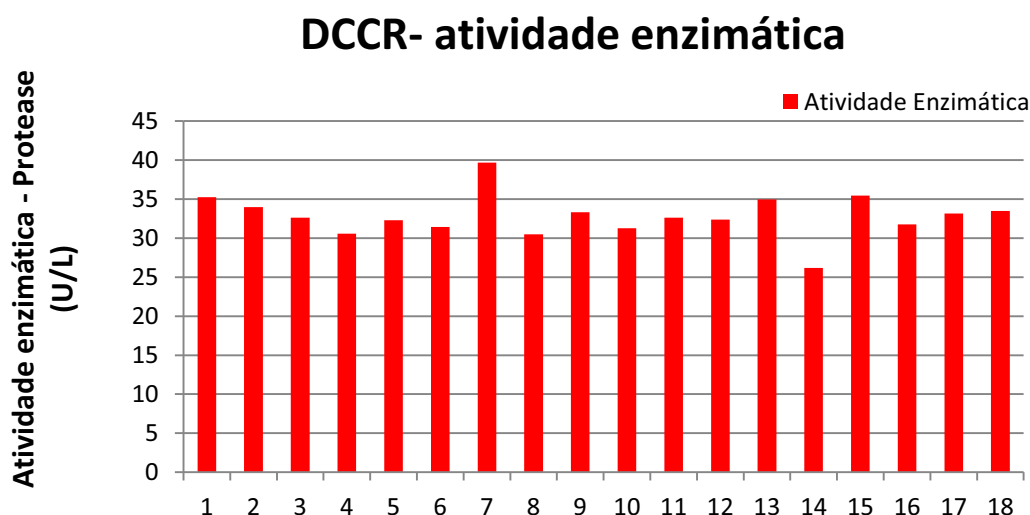
bacteriológica, uma vez que o desenho é plausível de aplicação industrial, visando o menor custo com insumos básicos para a produção. A necessidade de uma fonte suplementar proteica, tendo em vista que a cepa M36 apresentou halo proteico representativo quando crescido em Skim Milk, também foi considerado para a permanência da variável nas amostras do DCCR.

Tabela 18. Apresentação das 3 variáveis e as correspondentes faixas aplicadas ao delineamento DCCR do desenho experimental para a produção de protease de *Paecilomyces lilacinus*.

Variáveis	-1,68	-1	0	1	1,68
(1).Caseína	0,1g	0,16g	0,2g	0,26g	0,3g
(2).Extrato de soja (g/L)	0,5g	0,60g	0,75g	0,9g	1g
(3).pH	3	4,2	5	6,2	7

Seguindo os argumentos extraídos da análise das variáveis, pode se estabelecer as quantidades aplicadas em cada nível (Tabela 18) e com base na Matriz Codificada do delineamento composto central rotativo para 3 variáveis com 4 pontos centrais foi possível elaborar as 18 amostras (ensaios) (Tabela 19).

Figura 17. Resultados da atividade enzimática em U/L obtidos com o DCCR.



Dentre as 18 amostras, 44% apresentaram valores igual ou maior de atividade enzimática, quando comparada ao pico máximo de produção apresentado pela amostra 1 (33,68 U/L) do 2º fatorial fracionado. Com o valor máximo de 39,70 U/L (Figura 17) apresentado pelo ensaio 7, que supera em 17,87% o teste anterior. Este DCCR apresenta o limite de otimização para os parâmetros abordados desde início do desenho experimental, pois quando analisado estatisticamente (Tabela 20), todas as variáveis não apresentaram aporte

matemático relevante, indicando que dentre do delineamento proposto, não haverá alterações estatisticamente significativas para aumento da produtividade.

Tabela 19. Matriz aplicada para a elaboração das amostras a partir da Matriz Codificada do delineamento composto circular rotativo de 3 variáveis + 4 pontos centrais, com valores referentes à 50mL de meio.

Amostra	Caseína	Extrato de soja	pH
1	0,16g	0,60g	4,2
2	0,26g	0,60g	4,2
3	0,16g	0,9g	4,2
4	0,26g	0,9g	4,2
5	0,16g	0,60g	6,2
6	0,26g	0,60g	6,2
7	0,16g	0,9g	6,2
8	0,26g	0,9g	6,2
9	0,1g	0,75g	5
10	0,3g	0,75g	5
11	0,2g	0,5g	5
12	0,2g	1g	5
13	0,2g	0,75g	3
14	0,2g	0,75g	7
15	0,2g	0,75g	5
16	0,2g	0,75g	5
17	0,2g	0,75g	5
18	0,2g	0,75g	5

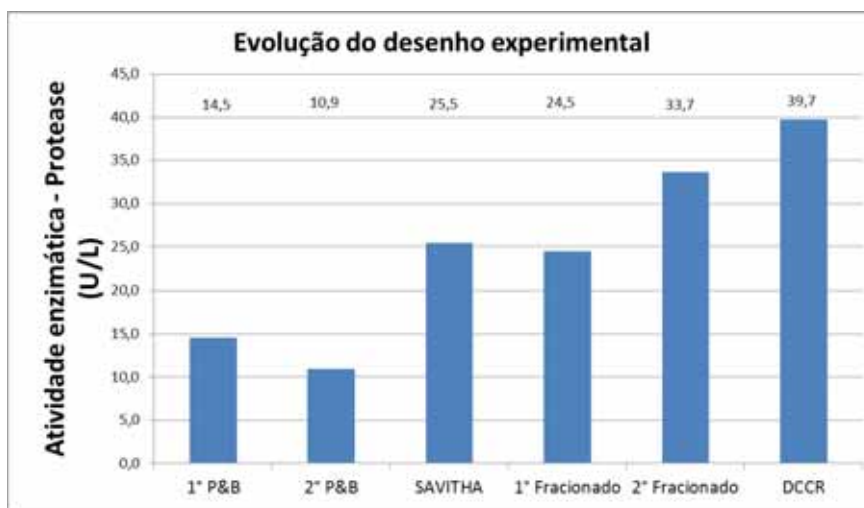
Tabela 20. Análise estatística software STATISTICA 7.0 sobre o efeito das 3 variáveis do DCCR.

Variáveis	Efeito	Erro Padrão	P (Valor)
Caseína (Q)	-0,06549	0,716803837	0,929445
(2) Extrato de soja (L)	0,00239	0,689138071	0,997313
Extrato de soja (Q)	0,01127	0,716803837	0,987838
(3)pH (L)	-0,97273	0,689138071	0,195782
pH (Q)	-0,67815	0,716803837	0,371804

5.4 EVOLUÇÃO E VALIDAÇÃO DO DESENHO EXPERIMENTAL

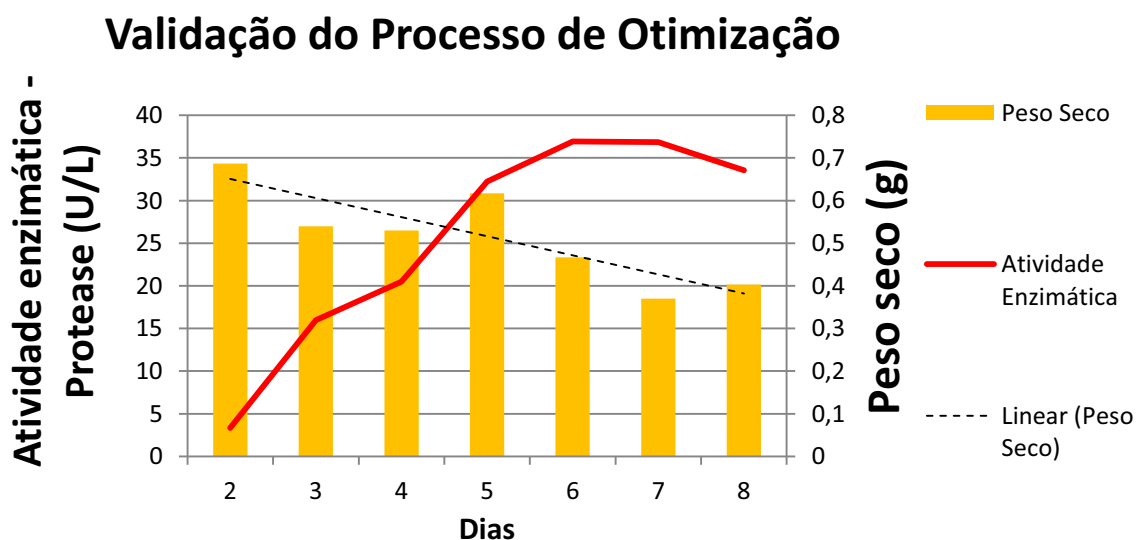
Com o intuito de uma análise geral de todas as etapas do desenho experimental, tornando factível o melhoramento da atividade enzimática através das variáveis aplicadas em cada ensaio, a Figura 18 mostra a evolução das máximas obtidas em cada etapa.

Figura 18. Evolução dos máximos valores encontrados em cada etapa do desenho experimental.



Utilizando o valor da triagem inicial como base (24 U/L) para as análises, o 1ºP&B apresentou máxima atividade enzimática com produtividade 40% menor e o 2ºP&B com 55%. O teste que determinou o meio mineral descrito por Savitha como meio base para os testes seguintes apresentou aumento de 6,25 %, assim como o 1º fatorial fracionado com 2,08%, 2ºfatorial fracionado com 40,42%, e o DCCR com 65,42% a mais que a triagem.

Figura 19. Validação dos resultados médios obtidos com o meio de cultura composto de 0,16 g de caseína, 0,90g de extrato de soja em meio salino de Savitha.



O teste de validação confirmou a capacidade da cepa M36 em produzir, a partir do meio de cultura otimizado, valores na ordem de 37 U/L (± 3). O teste de cinética foi essencial para mostrar que a partir do 5º dia de cultivo, nas devidas condições físicas e químicas, a cepa M36 demonstrou as maiores taxas de produção de proteases, possibilitando a redução no período de cultivo, plausível na redução dos gastos produtivos com recuperação da quantidade otimizada de enzima. A relação dos valores de peso seco e atividade enzimática são inversamente proporcionais como mostrado na Figura 19, com máximas atividades enzimáticas em regiões onde o peso seco foi reduzido, e para confirmar essa tendência, dentre as triplicatas do 5º foi possível observar que para a amostra na qual o peso seco foi maior (*outlier*), houve menor investimento energético para o metabolismo do sistema proteolítico, caso este *outlier* fosse removido dos resultados, a cinética apresentaria máximas em 5, 6 e 7 dias de cultivos com média de 37,53 U/L. A reta de tendência (linha tracejada) mostra que o peso seco tende a reduzir durante o período cultivado, e analisando o resultado do 8º dia de cultivo, é possível estimar que a produção enzimática decline após este período em resposta da diminuição da viabilidade das células no meio de cultura e da disponibilidade de nutrientes essenciais.

6 CONCLUSÃO

Os métodos de triagem utilizados no presente projeto foram aplicados com sucesso e permitiram a seleção de dois fungos ligninolíticos (D4 e M34) e de um proteolítico (M36), o qual foi o identificado como *Paecilomyces lilacinus* e escolhido para os experimentos de planejamento experimental visando otimização da atividade enzimática.

A dinâmica dos ensaios iniciais de produção de protease foi essencial para a verificação da importância da utilização do meio mineral para a produção enzimática, dando crédito ao meio composto por Savitha et al. (2007).

A partir de 12 variáveis simples, foi possível aumentar a atividade proteolítica *Paecilomyces lilacinus* M36 em 65,42%, certificando as premissas publicadas por Radha et al. (2011) que afirmam a melhor produtividade das enzimas proteolíticas em meios suplementados com fontes de nitrogênio e nutrientes provindos de caseína e derivados de soja. Os dados da validação da condição otimizada através da cinética analisada em 7 dias de cultivo, mostram que a obtenção da quantidade máxima da atividade enzimática pode ser atingida em 5 dias de cultivo, reduzindo o tempo de cultivo, diminuindo gastos produtivos, visando a aplicação industrial do processo.

Os dados derivados do presente trabalho revelam o potencial biotecnológico dos fungos marinho se estimulam a condução de novos estudos relacionados às enzimas produzidas pelos fungos estudados e selecionados.

REFERÊNCIAS

- ARO, N.; PAKULA, T.; PENTTILA, M. *Transcriptional regulation of plant cell wall degradation by filamentous fungi*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 719–739, 2005.
- ARORA, D. S.; GILL, P. K. *Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase*. **Enzyme and Microbial Technology** 28: 602–605.2001.
- BANERJEE, B.D., SETH, V.; BHATTACHARYA A.; PASHA S.T.; CHAKRABORTY A. K. *Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free radical scavengers*. **Toxicol. Lett.**, 107: 33-47. 1999
- BEYNOM, R.J.; BOND, J.S. *Proteolytic enzymes: A practical approach*. **Academic press. Oxford**. 1989.
- BON, E.P.S.; COSTA, R.B.; DA SILVA, M.V.A.; FERREIRA-LEITÃO, V.S.; FREITAS, S.P. FERRARA, M.A. *Mercado e Perspectivas de Uso de Enzimas Industriais e Especiais no Brasil*. In: BON, E.P.S.; FERRARA, M. A.; CARMO, M.L. *Enzimas em Biotecnologia: produção, aplicação e mercado*. Rio de Janeiro: Editora **Interciência**, p. 433-488. 2008.
- BONUGLI-SANTOS, R.C.; DURRANT, L.R.; DA SILVA, M.; SETTE, L.D. *Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi*. **Enzyme and Microbial Technology**, 46: 32-37, 2010a.
- BONUGLI-SANTOS, R.C.; DURRANT, L.R.; SETTE, L.D. *Laccase activity and putative laccase genes in marine-derived basidiomycetes*. **Fungal Biology**, 114: 863-872, 2010b.
- BONUGLI-SANTOS, R.C.; DURRANT, L.R.; SETTE, L.D. *The Production of Ligninolytic Enzymes by Marine-Derived Basidiomycetes and Their Biotechnological Potential in the Biodegradation of Recalcitrant Pollutants and the Treatment of Textile Effluents*. **Water, Air and Soil Pollution** (online first) DOI: 10.1007/s11270-011-1027-Y, 2011b.
- BONUGLI-SANTOS, R.C.; MAGRINI, M. J; VASCONCELOS, M.R.S.; PASSARINI, M.R.Z.; SETTE, L.D. *Potencial biotecnológico de fungos marinhos para produção de enzimas ligninolíticas e degradação de poluentes ambientais*. **Microbiologia in Foco**, 14: 29-37, 2011a.
- BONUGLI-SANTOS, R.C.; PASSARINI, M.R.Z.; RODRIGUES, M.V.N.; DURRANT, L.R.; SETTE, L.D. *Avaliação do potencial biosurfactante de fungos filamentosos associados a cnidários marinhos com atividade de degradação de HPAs*. **Microbiologia in foco**, 7: 12-17, 2009.
- CAVELLO, I., A.; HOURS, R. A.; CAVALITTO, S. F. *Bioprocessing of “Hair Waste” by Paecilomyces lilacinus as a Source of a Bleach-Stable, Alkaline, and Thermostable Keratinase with Potential Application as a Laundry Detergent Additive: Characterization and Wash Performance Analysis*. **Biotechnology Research International**, vol. 2012, Article ID 369308, 12 pages, 2012. doi:10.1155/2012/369308
-

CHARNEY, J. & TOMARELLI, R.M., *A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice*. **J. Biol. Chemical.**, v. 23, p. 501-505.1947. COHEN B.L. *Regulation of intracellular and extracellular neutral and alkaline proteases in Aspergillus nidulans*. **J. Gen. Microbiol** 79: 311±32. 1973.

CRUZ RAMÍREZ, M.G.; ET AL. *Screening for thermotolerant ligninolytic fungi with laccase, lipase, and protease activity isolated in Mexico*. **Journal of Environmental Management**, doi:10.1016/j.jenvman.2010.10.045. 2010.

DE JONG, E.; FIELD, J.A.; DE BONT, J.A.M. *Aryl alcohols in the physiology of ligninolytic fungi*. **FEMS Microbiol. Rev.** 13:153-187, 1994.

DINIZ, F.M.; MARTIN, A.M. *Hidrolisado protéico de pescado* In: OGAWA, M. & MAIA, E.L. **Manual de Pesca**. São Paulo: Varela, 1999.

DURAN, N.; ESPOSITO, E. *Biodegradação de Lignina e Tratamento de Efluentes por fungos ligninolíticos: atualização*. In Melo, IS, Azevedo, JL (Ed.) **Microbiologia Ambiental**, CNPMA/EMBRAPA Editora. p. 303-338, 2008

GOLD M.H.; ALIC M. *Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete Phanerochaete chrysosporium*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 57:605-622.1993.

GOLD, M. H.; WARIISHI, H.; VALLI, K. in *ACS Symposium on Biocatalysis in Agricultural Biotechnology* (Whitaker, J. R., & Sonnet P., Eds.) **ACS Symposium Series** 389, pp 127-140, **American Chemical Society**, Washington, D.C. 1989.

GREENE, R. V.; GOULD, J. M. *Electrogenic Symport of Glucose and Protons In membrane Vesicles of Phanerochaete Chrysosporium*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 118, 437-443. 1983.

HAAS R.; TSIVUNCHYK R.; STEINBACH O.; LÖW K., SCHEIBNER E. V.; HOFRICHTER, M.K. *Conversion of adamsite (phenarsarzin chloride) by fungal manganese peroxidase*. **Applied Microbiology and Biotechnology** 63: 564–566. 2004.

HAMMAN, S. *Bioremediation capabilities of white rot fungi*. Review **Article Spring**, p.12, 2004.

HAMMEL K.E.; CULLEN D. *Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis*. **Curr. Opin. Plant Biol.** 11:349-355, 2008.

HARVEY L. M.; MCNEIL B.; BERRY D.R.; WHITE S. *Autolysis in batch cultures of Penicillium chrysogenum at varying agitation rates*. **Enzyme Microb Technol** 22: 448±458. 1998.

HATAKKA A. *Biodegradation of lignin*. In: Hofrichter M, Steinbüchel A, editors. **Biopolymers**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH;. p. 129–80. 2001.

HEINFLING, A.; MARTINEZ, M.J.; MARTINEZ, A.T.; BERGBAUER, M.; SZEWZYK, U. *Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from Bjerkandera adusta and Pleurotus eryngii in a manganese-independent reaction*. **Applied and Environmental Microbiology**, 64: 2788–2793, 1998.

HILDEN, L.; JOHANSSON, G.; PETTERSSON, G.; LI, J.; LJUNGQUIST, P.; HERIKSSON, G. *Do the extracellular enzyme cellobiose dehydrogenase form a pathway in lignin biodegradation?* **Federation of European Biochemical Societies**, 477: 78-83, 2000.

HOFRICHTER M., VARES T., KALSI M., GALKIN S., SCHEIBNER K., FRITSCH W., HATAKKA A. *Production of manganese peroxidase and organic acids and mineralization of ¹⁴C-labelled lignin (14C-DHP) during solid-state fermentation of wheat straw with the white rot fungus Nematoloma frowardii.* **Appl. Environ. Microbiol.** 65:1864-1870.1990.

HORIKOSHI, K. *Alkaliphiles: Some Applications of Their Products for Biotechnology.* **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v 43, p.735-750.1991.

KANEKAR, P. P.; NILEGAONKAR, S. S.; SARNAIK, S. S. ET AL. Optimization of protease activity of alkaliphilic bacteria isolated from na alkaline lake in India. **Bioresource technology**, Amsterdam, v. 82, p. 87-93, 2002.

KAPICH A.; HOFRICHTER M.; VARES T.; HATAKKA A. *Coupling of manganese peroxidase-mediated lipid peroxidation with destruction of nonphenolic ligninmodel compounds and ¹⁴C-labeled lignins.* **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 259 , pp. 212–219. 1991.

KAUSHIK, P.; MALIK, A.; *Fungal dye decolourization: Recent advances and future potential.* **Environment International**, 35:127–141, 2009.

KERSTEN P.; CULLEN D. *Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading basidiomycete Phanerochaete chrysosporium.* **Fungal Genet. Biol.** 44:77-87, 2007.

KERSTEN, P. J. *Glyoxal oxidase of Phanerochaete chrysosporium: its characterization and activation by lignin peroxidase.* **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 87: 2936–2940. 1990.

KERSTEN, P. J.; AND CULLEN, D. Cloning and characterization of a cDNA encoding glyoxal oxidase, a peroxide-producing enzyme from the lignindegrading basidiomycete Phanerochaete chrysosporium.**Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 90:7411–7413. 1993.

KIMURA, M. *A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions throughcomparative studies of nucleotide sequences.* **J Mol Evol** 16:111-120. 1980.

KIRK, T.K. *Lignin degradation: basic research progress, and applications in soil remediation and biopulping.* Inn: **Cellulosics: Pulp, fibre and environmental aspects.** Kennedy, J.F.; Phillips, G.O.; Williams, P.A. (eds.). New York: Ellis Horword 63: 421-430, 1993.

KIRK, T. K.; CROAN, S.; TIEN, M.; MURTAGH, K. E.; FARRELL, R. L. *Product ion of multiple ligninases by Phanerochaete chrysosporium: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain.* **Enzyme Microb. Technol.** 8: 27 – 3. 1986.

KIRK, T. K.; CULLEN, *Enzymology and molecular genetics of wood degradation by white-rot fungi*. In R. A. Young and M. Akthar (eds) **Environmentally Friendly Technologies for the Pulp and Paper Industry**, John Wiley & Sons, New York, NY. 273-307, 1998.

KIRK, T.K.; FARREL, R.L. *Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin*. **Annual Review of Microbiology**. 41: 465-505, 1987.

KUMAR D.; BHALLA T. C. *Microbial proteases in peptide synthesis: approaches and application*. **Appl Microbiol Biotechnol** 68: 726–736. 2005.

KUMAR, C. G.; TAKAGI, H. *Microbial alkaline preteases: from a industrial view poit*. **Biotechnology Advancy**, New York, 17: 561-594, 1999.

KUWAHARA, M.; GLENN, J. K.; MORGAN, M. A.; GOLO, M. H. *Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic culture of Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters** 169: 247-250.1984.

KUWAHARA, M.; GLENN, J. K.; MORGAN, M. A.; GOLO, M. H. *Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic culture of Phanerochaete chrysosporium*. **FEBS Letters** 169: 247-250.1984.

LUNDELL T. *Ligninolytic system of the white-rot fungus Phlebia radiata: lignin model compound studies*. **Ph.D. Thesis, Department of Applied Chemistry and Microbiology, University of Helsinki**, Helsinki, 90 p., 1993.

LUNDELL T.; SCHOEMAKER H.; HATAKKA A.; BRUNOW G. *New mechanism of the C α -C β cleavage in non-phenolic arylglycerol β -aryl ether lignin substructures catalyzed by lignin peroxidase*. **Holzforschung** 47:219-224.1993.

MARTÍNEZ A.T. *Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases*. **Enzyme Microb. Technol.** 30:425-444, 2002.

MARTINS, M. A. M; LIMA, N.; SILVESTRE A. J. D.; QUEIROZ, M. .J, *Comparative studies of fungal degradation of single or mixed bioaccessible reactive azo dyes*. **Chemosphere** 52:967-973. 2003.

MCNEIL B.; BERRY D. R.; HARVEY L. M.; GRANT A.; WHITE S. *Measurement of autolysis in submerged batch cultures of Penicillium chrysogenum*. **Biotech Bioeng** 57: 297±305. 1998.

MENEZES, C.B.A.; BONUGLI-SANTOS, R.C; MIQUELETTTO, P.B.; PASSARINI, M.R.Z.; SILVA, C.H.D.; JUSTO, M.R.; LEAL, R.R. ; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; OLIVEIRA, V.M.; BERLINCK, R.G.S.; SETTE, L.D. *Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil*. **Microbiological Research**, 165: 466-482, 2010.

MILACH, S. C. K.; TISIAN, L.M.; WEILER, R. et al. *Conteúdo de proteína em genótipos de aveia cultivados em diferentes ambientes do sul do Brasil*. In: Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Aveia, 20, Pelotas. **Anais. Pelotas: UFPEL**, 2000.

NARAYANA, K. J. P.; VIJAYALAKSHMI M. *Production of Extracellular Protease by Streptomyces albidoflavus*. **Asian Journal of Biochemistry**, 3: 198-202. 2008.

NISHIDA, A.; ERIKSSON, K.-E. *Formation, Purification and Partial Characterization of Methanol Oxidase, A H₂O₂ – Producing Enzyme in Phanerochaete chrysosporium*. **Biotechnol. Appl. Biochem.** 9: 325-338. 1987.

O'DONNELL, K. FUSARIUM.; REYNOLDS D. R.; TAYLOR J. W.; *The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics*. **CAB International**, Wallingford, pp 225–233.1993.

OTTONI, C. A.; SANTOS C.; KOZAKIEWICZ, Z.; LIMA, N. *White-rot fungi capable of decolourising textile dyes under alkaline conditions*. **Folia Microbiol** DOI: 10.1007/s12223-012-0196-4. 2012.

PASSARINI, M.R.Z.; SETTE L.D.; RODRIGUES, M.V.N. *Improved extraction method to evaluate the degradation of selected PAHs by marine fungi grown in fermentative medium*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 22: 564-570, 2011.

PASSARINI, M.R.Z; RODRIGUES, M.V.N; DA SILVA, M.; SETTE, L.D. *Marine-derived filamentous fungi anf their potential application for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation*. **Marine Pollution Bulletin**, 62: 364-370, 2011.

PHADATARE, S. U.; DESHPANDE, V. V.; SRINIVASAN, M. C. *High activity alkaline protease from Conidiobolus coronatus (NCL 86.8.20): Enzyme production and compatibility with commercial detergents*. **Enzyme Microb. Technol.**, 15:72-76, 1993.

RADHA, S.; NITHYA, V. J. ; R. HIMAKIRAN BABU, R. ; SRIDEVI, A. ; PRASAD, N. B. L.; NARASIMHA G. *Production and optimization of acid protease by Aspergillus spp under submerged fermentation*. **Arch. Appl. Sci. Res.** 3 (2):155-163. 2011.

RAO, M. B.; TANKSALE A. M., GHATGE M. S., DESHPANDE V. V. *Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases*. **Microbiology and Molecular biology Reviews**, Washington, 62:597-635, 1998.

SAVITHA, J.; SRIVIDYA, S.; JAGAT, R.; PAYAL, P.; PRIYANKI, S.; RASHMI, G. W.; ROSHINI, K. T.; SHANTALA, Y. M. *Identification of potential fungal strain(s) for the production of inducible, extracellular and alkalophilic lipase*. **African journal of biotechnology**, v. 6, n. 5, p. 564-568. 2007.

SCHOEMAKER H.E.; LUNDELL T.K.; HATAKKA A.I.; PIONTEK K. *The oxidation of veratryl alcohol, dimeric lignin models and lignin by lignin peroxidase - the redox cycle revisited*. **FEMS Microbiol. Rev.** 13:321-332.1994.

SETTE, L.D.; OLIVEIRA, V.M.; RODRIGUES, M.F.A. *Microbial lignocellulolytic enzymes: industrial applications and future perspectives*. **Microbiology Australia**, 29:,18-20, 2008.

SHAHEEN, M., SHAH, A. A., HAMEED, A., HASAN, F. *Influence of culture conditions on production and activity of protease from Bacillus subtilis BS1*. **Pak. J. Bot.**, 40(3): 2161-2169. 2008.
SINGH, J.; VOHRA, R. M.; SAHOO, D. K. *Enhanced production of alkaline protease by Bacillus sphaericus using fed-batch culture*. **Process Biochem.**, v. 39, n. 9, p. 1093-1101, 2003.

STEFFEN, K. T.; HATABAKKA, A.; HOFRICHTER, M. *Removal and mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by litter-decomposing basidiomycetous fungi*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, p. 212–217, 2002.

TAMURA, K., J. DUDLEY, M. NEI AND S. KUMAR, 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol. Biol. Evol.**, 24: 1596-1599. 2011.

TIEN, M.; KIRK, T. K. *Lignin-degrading enzyme from Phanerochaete chrysosporium: Purification, characterization and catalytic properties of unique H₂O₂ requiring oxygenase*. **Proceedings of the National Academy of Science USA** 81: 2280-2284.1984.

VIEIRA, C. R.; CABRAL, L. C.; PAULA, A. C. O. Composição centesimal e conteúdo de aminoácidos, ácidos graxos e minerais de seis cultivares de soja destinadas à alimentação humana. **Pesq. Agrop. Bras.**, 34, 1277-1283. 1999.

WANG, Y.; VAZQUEZ-DUHALT, R.; PICKARD, M.A. *Manganese–lignin peroxidase hybrid from Bjerkandera adusta oxidizes polycyclic aromatic hydrocarbons more actively in the absence of manganese*. **Canadian Journal of Microbiology**. 49:675–82. 2003.

WESENBERG, D.; KYRIAKIDES, I.; AGATHOS, S.N. *White–rot fungi and their enzymes for the treatment of industrial dye effluents*. **Biotechnol. Advan.** 22: 161–187.2003.

BIBLIOGRAFIA

RODRIGUES, M. I., LEMMA, A. F.; Planejamento de experimentos e otimização de processos. 2 ed. Campinas: **Cárita Editora**. 358p. 2009.

