

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

GISELLE KOBATA KIMURA

**“INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL CELULOLÍTICO DE
BACTÉRIAS ORIUNDAS DE PROCESSO DE
COMPOSTAGEM”**

CAMPINAS, 2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



GISELLE KOBATA KIMURA

**“INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL CELULOLÍTICO DE
BACTÉRIAS ORIUNDAS DE PROCESSO DE
COMPOSTAGEM”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
GISELLE KOBATA KIMURA
Fabiana Fantinatti Garboggini
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao
Instituto de Biologia para
obtenção do Título de Mestre
em Genética e Biologia
Molecular, na área de
Microbiologia.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Fabiana Fantinatti Garboggini
Co-Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Suzan Pantaroto Vasconcellos

CAMPINAS,
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

K572i	<p>Kimura, Giselle Kobata, 1985- Investigação do potencial celulolítico de bactérias oriundas de processo de compostagem / Giselle Kobata Kimura. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.</p> <p>Orientador: Fabiana Fantinatti Garboggini. Coorientador: Suzan Pantaroto de Vasconcellos. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Celulase. 2. <i>Bacillus</i> (Bacteria). 3. Celulose. 4. Compostagem. I. Fantinatti-Garboggini, Fabiana. II. Vasconcellos, Suzan Pantaroto de. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.</p>
-------	--

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Investigation of the cellulolytic potential of bacteria from the composting process

Palavras-chave em inglês:

Cellulase

Bacillus (Bacteria)

Cellulose

Composting

Área de concentração: Microbiologia

Titulação: Mestra em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Fabiana Fantinatti Garboggini [Orientador]

Suzete Aparecida Lanza Destéfano

Michel Rodrigo Zambrano Passarini

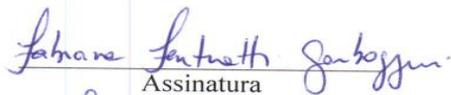
Data de defesa: 30-01-2014

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

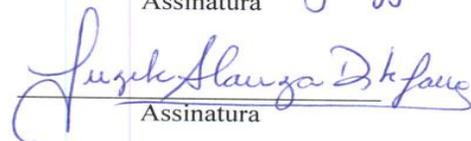
Campinas, 30 de janeiro de 2014

BANCA EXAMINADORA

Dra. Fabiana Fantinatti Garboggini (orientadora)


Assinatura

Dra. Suzete Aparecida Lanza Destéfano


Assinatura

Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini


Assinatura

Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte

Assinatura

Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos

Assinatura

Resumo

Bactérias e fungos têm sido largamente explorados devido às suas habilidades em produzir uma grande variedade de enzimas, entre elas, as celulases que se destacam devido ao seu potencial em degradar materiais lignocelulósicos em açúcares fermentáveis, que podem então ser convertidos, por exemplo, em biocombustíveis. O presente trabalho visou a bioprospecção de bactérias isoladas a partir do processo de compostagem realizado pela Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP), quanto à produção de enzimas celulolíticas, além da caracterização taxonômica das linhagens de interesse. Para tanto, os micro-organismos oriundos do processo de compostagem da FPZSP foram isolados, preservados e caracterizados macroscopicamente. Dentre as linhagens isoladas, 168 foram testadas numa triagem qualitativa para a produção de celulases, obtendo-se 135 micro-organismos com potencial celulolítico evidenciado pela formação de halos de hidrólise em meio de cultura contendo carboximetilcelulose. Destes, 10 linhagens apresentaram halos translúcidos com diâmetros entre 1,3 cm e 1,9 cm, as quais foram avaliadas quanto a atividade celulotica em ensaios quantitativos monitorados durante 7 dias, em duas condições de pH distintas: 4,8 e 7,4. Os melhores tempos de incubação verificados foram de sete e cinco dias para os valores de pH 4,8 e 7,4, respectivamente. Em seguida, foram selecionados linhagens para os ensaios de delineamento experimental e otimização das atividades enzimáticas. No planejamento P&B, a melhor atividade celulolítica verificada foi de 3,6392 FPU/mL obtida a partir da linhagem FPZSP 143, no pH 4,8. Esta linhagem foi então selecionada e o planejamento do tipo Delineamento Composto Central Rotacional – DCCR aplicado, promovendo dessa maneira, um aumento 0,4574 FPU/mL em relação ao experimento do planejamento anterior. Posteriormente, o experimento foi validado e o resultado máximo alcançado para atividade celulolítica da linhagem FPZSP 143 foi de 4,6435 FPU/mL. Cinco linhagens selecionadas com atividade celulolítica foram identificadas por análise de sequências do gene RNA ribossomal 16S como membros

do gênero *Bacillus*, bactérias frequentemente encontradas em ambientes da compostagem e que tem sido largamente reportada como produtoras de enzimas celulolíticas.

O processo de compostagem demonstrou ser um ambiente em potencial para a produção de celulasas de interesse para diversos ramos da indústria, sendo os representantes do gênero *Bacillus* os melhores produtores de enzimas celulolíticas. Embora as bactérias tenham sido isoladas de um ambiente com pH em torno de 7,4, há um potencial para a produção de celulasas em pH mais ácidos, evidenciando sua aplicabilidade em diferentes condições. Essa característica torna-se relevante quando se leva em consideração os processos industriais, onde uma condição diferente e específica é exigida em cada processo, tornando as enzimas celulolíticas oriundas de processo de compostagem grandes aliadas no desenvolvimento e otimização de processos industriais.

Palavras-chave: celulase; compostagem; celulose; *Bacillus* (Bactéria).

Abstract

Bacteria and fungi have been extensively explored due to their ability to produce a variety of enzymes, including the cellulases that stand out because of their potential to degrade lignocellulosic materials to fermentable sugars, which can then be converted, for example, in biofuels. The present work aimed bioprospecting of bacteria isolated from the composting process conducted by Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP), for the production of cellulolytic enzymes and the taxonomic characterization of strains of interest. For both, the microorganisms derived from the composting process of FPZSP were isolated, preserved and characterized macroscopically. Among the isolates, 168 were tested for production in a qualitative screening of cellulases, obtaining 135 cellulolytic microorganisms with potential evidenced by the formation of halos of hydrolysis in culture medium containing carboxymethylcellulose. These, 10 strains showed translucent halos with diameters between 1.3 cm and 1.9 cm, which were evaluated for activity in cellulolytic quantitative assays monitored for 7 days under two different pH conditions: 4.8 and 7.4. The best times of incubation recorded were seven and five days to pH 4.8 and 7.4, respectively. Then, strains for testing experimental design and optimization of enzymatic activities were selected. In Planning P&B, the best cellulolytic activity verified was 3.6392 FPU/mL obtained from FPZSP 143, at pH 4.8. This strain was selected and the DCCR applied, thus promoting an increase of 0.4574 FPU/mL compared to the previous experiment planning. Subsequently, the experiment was validated and the maximum score achieved for cellulolytic activity FPZSP 143 strain was 4.6435 FPU/mL. Five strains with cellulolytic activity were identified by sequence analysis of the 16S ribosomal RNA gene as members of the genus *Bacillus*, bacteria frequently encountered in composting environments and has been widely reported as producing cellulolytic enzymes.

The composting process proved to be a potential environment for the production of cellulases of interest for various branches of industry, being the representatives of the genus *Bacillus* the best producers of cellulolytic enzymes. Although bacteria have been isolated from an environment with a pH around 7.4, there is a potential for the production of cellulases in more acidic pH, indicating their applicability in different conditions. This feature becomes important when one takes into account the industrial processes, where a different and specific condition is required in each case, making the cellulolytic enzymes derived from composting process a good allied in developing and industrial process optimization.

Key words: cellulase; composting; cellulose; *Bacillus* (Bactéria).

Sumário

Lista de Figuras	xix
Lista de Tabelas	xxi
Lista de Abreviaturas e Símbolos	xxiii
1 Introdução	1
2 Objetivos	2
3 Revisão bibliográfica	3
3.1 Celulose.....	3
3.2 Celulases	5
3.3 Aplicações das celulases	7
3.4 Bactérias celulolíticas	9
3.5 Compostagem de resíduos orgânicos.....	11
3.6 Delineamento experimental	14
4 Material e métodos.....	15
4.1 Manutenção, preservação e reativação dos isolados.....	15
4.2 Análise qualitativa da produção de celulases.....	16
4.3 Análise quantitativa da atividade celulolítica	17
4.4 Delineamento experimental	19
4.4.1 Planejamento experimental do tipo Plackett-Burman (P&B).....	19
4.4.2 Planejamento experimental do tipo DCCR.....	21
4.5 Validação do planejamento experimental do tipo DCCR.....	22
4.6 Identificação molecular das bactérias que apresentaram atividade celulolítica.....	23
4.6.1 Extração e quantificação do DNA genômico.....	23
4.6.2 Amplificação do gene RNA ribossomal 16S de bactérias	24
4.6.3 Sequenciamento e análise filogenética de gene RNA ribossomal 16S.....	25
5 Resultados e discussão	25
5.1 Análise qualitativa da produção de celulases.....	25
5.2 Análise quantitativa da atividade enzimática.....	27
5.3 Caracterização taxonômica	30
5.4 Análise do delineamento experimental	32
5.4.1 Planejamento experimental do tipo Plackett-Burman (P&B).....	32
5.4.2 Planejamento experimental do tipo DCCR.....	37

5.5	Validação	43
5.6	Evolução da atividade celulolítica	43
6	Conclusões	45
7	Referências bibliográficas.....	46
8	Anexos	56

Ao meu querido pai (*in memoriam*), meu eterno herói.

Dedico.

Agradecimentos

À minha orientadora Dra Fabiana Fantinatti-Garboggini por todos esses anos de dedicação, por estar sempre disposta a me auxiliar, no que fosse necessário. Pelo seu apoio nos momentos difíceis, pela sua confiança no meu trabalho e no meu potencial e acima de tudo, por ser essa pessoa singular, com tantas qualidades boas, que me ensinou muito mais que apenas conhecimentos acadêmicos. Muito obrigada!

À minha co-orientadora Profa. Dra Suzan Pantaroto de Vasconcellos pela confiança depositada em mim, por me inspirar a sempre continuar lutando para atingir meus objetivos e por ser essa pessoa maravilhosa a quem admiro e respeito muito.

À Dra Rafaella Costa Bonugli Santos pelo auxílio indispensável ao longo de todo este trabalho, pela dedicação mesmo nos dias mais ocupados, pelo ombro amigo na hora do desespero e pela paciência nas dúvidas e dificuldades. Sua colaboração foi de extrema importância para o desenvolvimento deste projeto. Obrigada por tudo!

Às pesquisadoras Dra. Valéria Maia de Oliveira, Dra. Derlene Attili de Angelis e Dra. Lara Durães Sette pelos anos de boa convivência e aprendizado na Divisão de Recursos Microbianos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos da Divisão de Recursos Microbianos do CPQBA/UNICAMP Alysson, Bárbara, Bruna, Cláudia, Dani Barreta, Dani Domingos, Éricka, Fernando, Natália, Júlia, Maria Rapha, Leandro, Michel, Patrícia, Geizecler, Virgínia, em especial, às técnicas Milena, Viviane e Samantha, por compartilharem comigo todos os dias do desenvolvimento deste projeto, contribuindo com ideias

iluminadoras, confortando nos momentos de desespero e auxiliando sempre que possível para que tudo corresse bem ao longo de todo o trabalho.

À equipe do Laboratório Multidisciplinar em Saúde e Meio Ambiente da Universidade Federal de São Paulo, em especial à Dra Patrícia Locosque, à aluna Bruna Buscariollo e ao aluno Leonardo Jun, pelo fornecimento das linhagens utilizadas neste estudo, bem como na colaboração com informações complementares às mesmas.

À equipe da Divisão de Farmacologia e Toxicologia do CPQBA/UNICAMP, em especial à Dra Ana Lúcia, que disponibilizou o espectrofotômetro de placa para leitura dos meus resultados.

Aos professores Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini, Dra. Suzete Lanza Destéfano, Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte e Dra. Lara Durães Sette participantes das bancas de qualificação e pré-banca pela grande contribuição e valiosas sugestões que enriqueceram o trabalho.

À Maria de Lourdes Fagundes, secretária do Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, pela constante e pronta disposição em ajudar nas questões administrativas da vida acadêmica.

À Capes pela bolsa concedida, que custeou todas as despesas durante todo o desenvolvimento do projeto.

Agradecimentos especiais

À minha amada mãe Maria Goretti por nunca poupar esforços para que todos os meus sonhos e objetivos pudessem ser realizados. Por ser minha amiga, meu braço direito, por estar sempre ao meu lado, me dando apoio, carinho, força e conforto nas horas difíceis. Obrigada, principalmente, pelo seu amor! Você é a razão da minha vida!

Ao meu marido Rafael Noberto, meu amor, meu amigo e companheiro. Pelos dias de muita paciência, pelo companheirismo nunca negado, pelo abraço gostoso que me confortou em tantos dias difíceis. Por nunca deixar que eu desistisse nem deixasse de acreditar em mim. Obrigada pelo seu amor e por me fazer muito feliz e realizada. Te amo muito!

Aos meus irmãos Lucimara e Rafael pelo forte laço de amizade que criamos entre nós. Muito mais que irmãos, vocês são meu porto seguro, meus alicerces para a vida inteira. Obrigada por sempre estarem ao meu lado, na torcida pra que tudo sempre desse certo. Amo vocês!

Às minhas amigas de infância Isabela, Jaqueline e Marta pela lealdade, fidelidade e companheirismo cultivados com muito carinho ao longo desses 18 anos. Por sempre estarem presentes mesmo na distância e por nunca deixarem que nada nesse mundo pudesse nos separar. Vocês são especiais e sou muito feliz que tenho vocês em minha vida.

Aos queridos amigos Cristina, Daiane, João Kléber e Mariana por estarem sempre na torcida pelo meu sucesso, pelo apoio nunca negado, pelas manhãs, tardes e noites de muita conversa boa sobre diversas coisas da vida. Por fazer dos meus dias e da minha vida muito mais coloridos. Obrigada por tudo!

Lista de Figuras

Figura 1. Estrutura da celulose	04
Figura 2. Representação esquemática dos polimorfismos da celulose e as principais etapas para obtenção de cada uma das suas formas	05
Figura 3. Representação gráfica do modo de ação do complexo multienzimático na fibra de celulose	06
Figura 4. Curva padrão de glicose	19
Figura 5: Número de bactérias produtoras de celulasas distribuídas dentre as condições de pH avaliadas	26
Figura 6. Halos translúcidos produzidos pelas linhagens em resposta a atividade celulolítica.....	27
Figura 7. Árvore filogenética construída a partir de sequências do gene RNA ribossomal 16S das linhagens produtoras de enzimas celulolíticas	31
Figura 8. Efeito estatisticamente significativo ($p < 0,1$) de 12 variáveis na produção de celulasas pela linhagem FPZSP 143.....	35
Figura 9. Evolução da atividade celulolítica pela linhagem FPZSP 143. 1-Seleção do tempo de incubação; 2-Planejamento P&B; 3-Planejamento DCCR; 4-Validação do planejamento DCCR	44

Lista de Tabelas

Tabela 1. Matriz A: Planejamento experimental Plackett-Burman (P&B) realizado com cinco linhagens selecionadas, as quais apresentaram os melhores índices de atividade enzimática após ensaio quantitativo.....	20
Tabela 2. Matriz B: Planejamento experimental do tipo DCCR.....	22
Tabela 3. Valores em FPU/mL da atividade celulolítica em pH 4,8 das dez linhagens monitoradas durante sete dias de ensaio.....	28
Tabela 4. Valores em FPU/mL da atividade celulolítica em pH 7,4 das 10 linhagens monitoradas durante sete dias de ensaio.....	29
Tabela 5. Valores do pH de leitura, pH de crescimento e atividade enzimática dos ensaios mais relevantes após a aplicação do planejamento do tipo Plackett-Burman.....	33
Tabela 6. Valores do pH de leitura e atividade enzimática (FPU/mL) dos ensaios mais relevantes após a aplicação do planejamento do tipo DCCR.....	39
Tabela 7. Coeficientes de regressão gerados a partir dos resultados obtidos da produção de FPU pela linhagem 143 no DCCR.....	41
Tabela 8. Anova do modelo quadrático para a produção de FPU pela linhagem 143.....	42

Lista de Abreviaturas e Símbolos

°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
μmol	Micromol
16S	Gene RNA ribossomal em procariotos
BG	β-glucosidase
CMC	Carboximetilcelulose
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
EnG	Endoglucanase
ExG	Exoglucanase
FPU	<i>Filter Paper Unity</i>
FPZSP	Fundação Parque Zoológico de São Paulo
g	Grama
h	Hora
HTS	<i>High-Throughput Screening</i>
L	Litro
M	Molar
m ²	Metros quadrados
mg	Miligrama

Min	Minuto
mM	Milimolar
mL	Mililitro
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
nV	Nanovolts
P&B	Plackett-Burman
PCR	Reação de Polimerase em Cadeia
pH	Potencial hidrogeniônico
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
seg	Segundo
Taq	<i>Thermus aquaticus</i> (enzima DNA polimerase)
TE	Tris-EDTA
UI	Unidade Internacional
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UPCO	Unidade de Produção de Composto Orgânico
μM	Micromolar

1 Introdução

Os processos biotecnológicos vêm contribuindo de uma maneira relevante no desenvolvimento tecnológico mundial, sendo as enzimas de grande importância em diferentes aplicações nos diversos ramos da indústria (BORTOLAZZO, 2011). Fungos e bactérias têm sido largamente explorados devido às suas habilidades em produzir uma grande variedade de enzimas, entre elas, celulasas (MAKI et al., 2009), que se destacam devido ao seu potencial em degradar materiais lignocelulósicos em açúcares fermentáveis, que podem então ser convertidos, por exemplo, em biocombustíveis (BALAT e BALAT, 2009).

Estruturalmente, as celulasas são compostas por um complexo multienzimático constituído por endoglucanases (EC 3.2.1.4) e exoglucanases (EC 3.2.1.91), que agem sinergicamente para que ocorra a hidrólise eficiente do cristal de celulose, e pelas β -glucosidases (EC 3.2.1.21) que clivam os produtos da ação das duas enzimas anteriores em glicose (MAKI et al., 2009).

Neste contexto, existem no Brasil muitos ambientes ainda pouco explorados que podem guardar verdadeiras fontes de biodiversidade com potencial à aplicação em processos biotecnológicos. Dentre esses ambientes destaca-se o processo de compostagem realizado na Fundação Parque Zoológico de São Paulo. Conceitualmente, a compostagem é um processo bio-oxidativo caracterizado por uma sucessão de diferentes populações microbianas, com uma larga variedade de micro-organismos envolvidos no processo (MONDINI e INSAM, 2003; TANG et al., 2004; HARUTA et al., 2005). Numerosos estudos têm fornecido informações sobre a diversidade microbiana presente no processo de compostagem e um significativo número de micro-organismos tem contribuído para os avanços na área da genética, taxonomia (ALBRECHT et al., 2009) e biotecnologia.

A compostagem de dejetos, carcaças de animais, restos de camas e resíduos alimentares dos mesmos, além de resíduos vegetais, tais como folhas, galhos e árvores caídas na área da Fundação

Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP), gera uma biomassa rica em resíduos orgânicos. Uma vez que o parque se encontra circundado pela Mata Atlântica e abriga diversos animais provenientes do mundo inteiro, esta compostagem pode ser considerada uma verdadeira fonte de biodiversidade microbiana e enzimas catalíticas provenientes dos micro-organismos ali encontrados.

Diante dessas considerações o presente trabalho visou a bioprospecção de bactérias isoladas a partir do processo de compostagem realizado pela Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP), quanto à produção de enzimas celulolíticas, além da caracterização taxonômica das linhagens de interesse. Torna-se importante ressaltar que os resultados obtidos poderão resultar na aplicação desses micro-organismos em diversos processos industriais, sendo interessante principalmente para a indústria de biocombustíveis, e ampliar o conhecimento acerca das bactérias oriundas de processo de compostagem e seu potencial biocatalítico.

2 Objetivos

O presente trabalho teve por objetivo principal a avaliação da atividade celulolítica de bactérias isoladas a partir da compostagem de dejetos de animais e de resíduos vegetais produzidos na Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP).

Para tanto, as seguintes etapas foram realizadas:

- Triagem inicial através do ensaio qualitativo dos micro-organismos, visando detectar os isolados potencialmente celulolíticos;
- Análise quantitativa da atividade enzimática dos micro-organismos selecionados no ensaio qualitativo;
- Delineamento experimental visando a investigação da atividade enzimática;
- Validação do delineamento experimental e a otimização da produção de celulasas;

- Identificação das bactérias produtoras de celulases por análise de sequência do gene RNA ribossomal 16S.

3 Revisão bibliográfica

3.1 Celulose

A celulose é considerada o composto orgânico mais abundante do planeta. O processamento industrial desse biopolímero está estimado entre 10^{10} e 10^{11} toneladas ao ano (SAMIR et al., 2005). Em 2012, a produção brasileira de celulose chegou a 14 milhões de toneladas, sendo o Brasil, o quarto produtor mundial segundo a Associação Brasileira de Celulose e Papel. Embora a madeira seja a principal fonte de celulose, ela também pode estar presente na folha (ex: sisal), no fruto (ex: algodão), no caule ou na estrutura rígida das plantas (ex: madeira, linho).

A celulose é um homopolissacarídeo linear formado por um dímero denominado celobiose, constituído de unidades de anidro-D-glicose unidas por ligações β -1,4 glicosídicas (HABIBI e ROJAS, 2010; BRAS et al., 2011). É constituída por fibras brancas sem odor e tem densidade por volta de 1,5. O monômero de anidro-D-glicose possui três grupos hidroxilas. Esses grupos e suas habilidades em formar fortes ligações de hidrogênio conferem à celulose importantes propriedades, como a estrutura microfibrilada, a organização hierárquica, onde regiões cristalinas altamente compactadas se alternam com regiões menos ordenadas denominadas regiões amorfas e a natureza altamente coesiva (Figura 1) (LAVOINE et al., 2012).

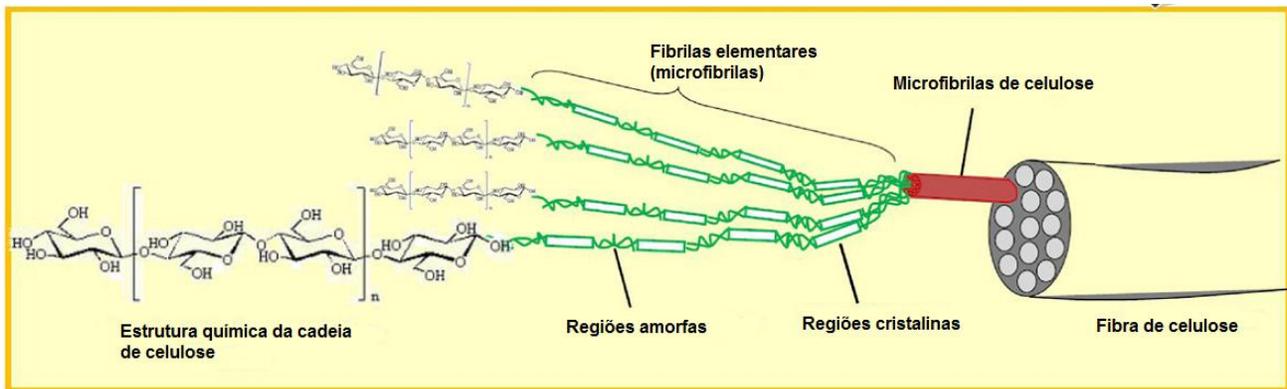


Figura 1. Estrutura da celulose (Adaptado de LAVOINE et al., 2012).

Há quatro diferentes polimorfismos da celulose: celulose I, II, III e IV. A celulose I, também conhecida por celulose nativa, é encontrada na natureza sob duas formas: I_{α} e I_{β} . A celulose II é a celulose regenerada, obtida após a recristalização ou mercerização com hidróxido de sódio aquoso. Este é o estado mais estável da forma cristalina (AULIN, 2009; SIQUEIRA et al., 2010). A principal diferença entre as formas I e II está na disposição de seus átomos: enquanto a celulose II apresenta arranjos antiparalelos, as cadeias da celulose I dispõem-se paralelamente (AULIN, 2009). As celulosas III_I e III_{II} são obtidas através do tratamento das celulosas I e II com amônia, respectivamente, e a celulose IV é produzida após o tratamento da celulose III com glicerol a 260 °C. A celulose I não pode ser transformada diretamente em celulose IV. (Figura 2) (WADA et al., 2004; LAVOINE et al., 2012).

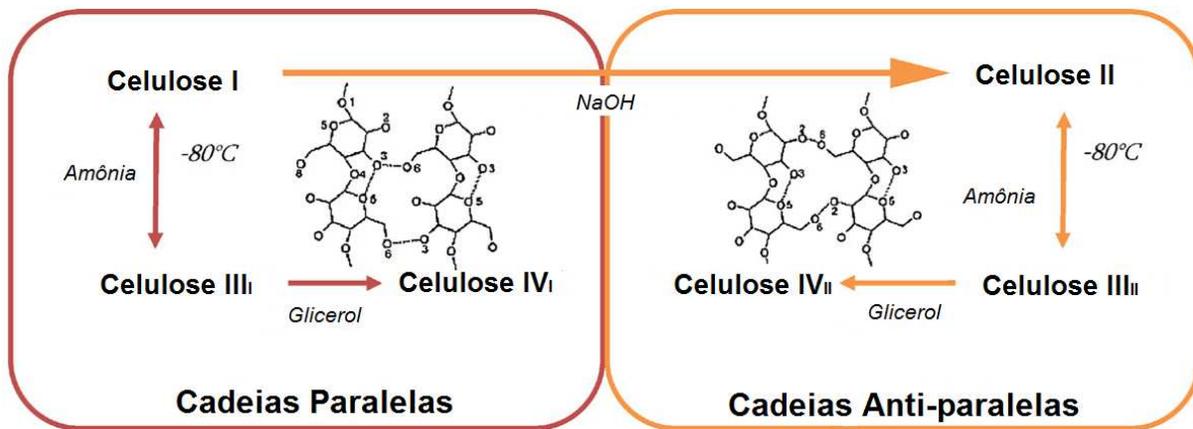


Figura 2. Representação esquemática dos polimorfismos da celulose e as principais etapas para obtenção de cada uma das suas formas (Adaptado de LAVOINE et al., 2012).

3.2 Celulases

As celulases são definidas como enzimas que hidrolisam as ligações β -1,4 glicosídicas da estrutura da celulose (GUPTA et al., 2013). São compostas por um complexo multienzimático constituído por endoglucanases (EC 3.2.1.4), exoglucanases (EC 3.2.1.91) e β -glucosidases (EC 3.2.1.21) (LYND et al., 2012). As endoglucanases (EnG) agem clivando as ligações β -1,4 glicosídicas nas regiões internas da fibra celulósica. Sua atividade pode ser avaliada utilizando-se celulose solúvel (carboximetilcelulose – CMC) como substrato. As exoglucanases (ExG) são ativas na região cristalina da celulose e clivam as ligações β -1,4 glicosídicas da cadeia terminal, formando açúcares de menor peso molecular, tais como a glicose e a celobiose. As β -glucosidases (BG), por sua vez, hidrolisam a celobiose e as celodextrinas, produzindo glicose que poderá ser assimilada pela célula. Há um alto grau de sinergismo entre as endo e as exoglucanases, o qual é necessário para que ocorra a hidrólise eficiente do cristal de celulose. Os produtos dessas duas enzimas inibem suas atividades e a β -glucosidase cliva esses produtos, dando continuidade ao processo (MAKI et al., 2009).

São conhecidas pelo menos três formas de sinergia entre as celulases: sinergia EnG-ExG, onde a endoglucanase atua nas regiões amorfas da fibra, disponibilizando terminais redutores e não redutores para atuação das exoglucanases; sinergia ExG-ExG, onde as exoglucanases atuam na hidrólise dos terminais redutores e não redutores liberados por ação das endoglucanases; e sinergias ExG-BG e EnG-BG, onde a celobiose e os oligossacarídeos são liberados servindo como substratos para a β -glucosidase (Figura 3) (BHAT e BHAT, 1997; LYND et al., 2002).

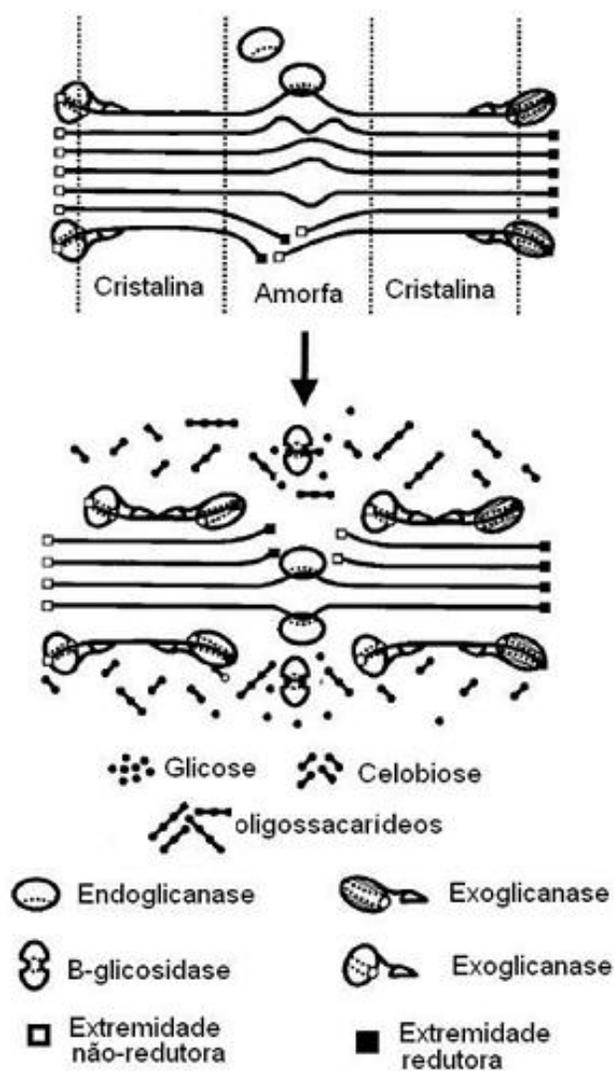


Figura 3. Representação gráfica do modo de ação do complexo multienzimático na fibra de celulose (LYND et al., 2002).

3.3 Aplicações das celulases

Atualmente, há um crescente interesse no potencial das celulases devido às suas mais diversas aplicações tanto na produção, quanto no processamento de compostos variados.

Na indústria de alimentos, as celulases vêm sendo utilizadas na extração do suco de frutas e vegetais (HUMPF e SCHRIER, 1991; SREENATH et al., 1994; BHAT, 2000; BERGQVIST et al., 2005; KUHAD et al., 2011), de pigmentos, de azeites de oliva e de carotenóides (GROHMAN e BALDWIN, 1992; FAVERI et al., 2008; BELITZ et al., 2009), na estabilização da textura de néctares e purês, além da diminuição de sua viscosidade (GRASSIN e FAUQUEMBERGUE, 1996; BHAT, 2000; HUI, 2006). São enzimas também utilizadas na alteração das propriedades sensoriais de frutas e vegetais, aumentando seu aroma e características voláteis (HUMPF e SCHRIER, 1991; KRAMMER et al., 1991; DAUTY, 1995; BHAT, 2000; HUI, 2006).

Na indústria de bebidas, a produção de cerveja envolve a maltagem da cevada, seguida pela fermentação do mostro. A maltagem depende principalmente da germinação das sementes, fase onde se inicia a biossíntese e ativação das amilases, carboxipeptidases e celulases. Estas agem em sinergia sob condições ótimas para um malte de alta qualidade. Neste caso, a adição de celulases é vantajosa não somente para melhorar a qualidade da cerveja, mas também para melhorar a eficiência da produção (GALANTE et al. 1998).

Ainda na indústria alimentícia animal, a celulase constitui a principal classe de enzimas utilizada para incrementar a ração de animais monogástricos e ruminantes (GRAHAM e BALNAVE, 1995; LEWIS et al., 1996; KUNG et al., 1997). Tais enzimas podem ser utilizadas para eliminar fatores de baixo valor nutricional presentes nas matérias-primas ou degradar certos componentes de cereais, a fim de melhorar seu valor nutricional (GUPTA et al., 2013).

Na indústria têxtil, as celulases são comumente utilizadas para a estonagem, biopolimento e finalização dos tecidos (KIRK et al., 2002; LIMA et al., 2005; IBRAHIMA et al., 2010). Na estonagem, a utilização dessas enzimas torna-se vantajosa por ser menos laboriosa, reduzir injúrias e criar a possibilidade de automatizar o processo (GALANTE et al., 1998; PAZARLIOGLU et al., 2005). Durante o biopolimento, as celulases agem em pequenas pontas das fibras que se projetam a partir da superfície do tecido, onde a ação mecânica remove essas fibras resultando no polimento dos tecidos (SUKUMARAM et al., 2005). As celulases removem essas pequenas fibras e imprecisões da superfície do tecido, suavizando a aparência, removendo manchas, melhorando a sua cor e brilho e aumentando sua capacidade hidrofílica (SUKUMARAM et al., 2005).

Na indústria de papel, as celulases têm sido utilizadas para vários propósitos. Além de modificar as propriedades da fibra para melhorar sua produtividade, as celulases têm se mostrado efetivas para a reciclagem de papéis de livros, revistas e jornais, demonstrando um valor adicional via *deinking* (KUHAD et al., 2010a, b, c). *Deinking* é um processo utilizado durante a reciclagem para remover a tinta de impressão dos papéis (SINGH et al., 2012), sendo a principal vantagem do *deinking* enzimático a eliminação do uso do álcali no processo de reciclagem de papel. Além disso, o uso das celulases em pH ácido, resulta na prevenção do amarelamento causado pelo álcali, simplificação do processo de *deinking* e redução da poluição ambiental (KIRK et al., 2002; KUHAD et al., 2010a, b, c; LIU et al., 2010).

Outra aplicação em potencial das celulases é a conversão de material celulósico em glicose e outros açúcares fermentáveis, que por sua vez podem ser utilizados como substrato microbiano para a produção de proteínas ou produtos de fermentação como o bioetanol (SUKUMARAM et al., 2005; KUHAD et al., 2010a, b, c).

A produção de bioetanol a partir de recursos renováveis através da fermentação representa um processo importante para a produção de combustíveis alternativos (SUKUMARAM et al., 2005;

KUHAD et al., 2010a, b, c, 2011). O etanol tem uma combinação única de propriedades, incluindo baixa emissão de gases de efeito estufa, um alto nível de sustentabilidade e a perfeita integração no sistema de transporte existente com potencial para ter um impacto de grande escala. (WARD e SINGH, 2002; GUPTA et al., 2009; KUHAD et al., 2010a, b, c).

Recentemente, as atenções têm se voltado para o bioprocessamento da biomassa celulósica para a produção de biocombustíveis, por meio de enzimas celulolíticas termofílicas, que devido à sua tolerância a elevadas temperaturas, oferecem várias vantagens em potencial, tais como melhora na hidrólise de substratos celulósicos; aumento das taxas de transferência de massa levando a uma melhor solubilidade do extrato; baixo risco de possíveis contaminações e aumento da flexibilidade em relação ao processo de produção, melhorando assim a economia global do processo. No entanto, a dificuldade na degradação da celulose coloca vários obstáculos na digestão termofílica da biomassa devido à falta de celulasas robustas que possam funcionar eficientemente a altas temperaturas e numa larga faixa de pH. Assim, bactérias termófilas degradadoras de celulose e suas enzimas têm grande potencial no desenvolvimento de tecnologias viáveis para a produção de combustíveis alternativos a partir de resíduos celulósicos originários da agricultura, florestas e lixos orgânicos municipais (RASTOGI et al., 2010).

3.4 Bactérias celulolíticas

Fungos e bactérias têm sido explorados devido às suas habilidades em produzir uma grande variedade de celulasas e hemicelulasas. Mais ênfase tem sido dada aos fungos pela sua capacidade em produzir grandes quantidades de enzimas celulolíticas, frequentemente menos complexas que as celulasas bacterianas e fáceis de extrair e purificar. No entanto, o isolamento e caracterização de novas celulasas obtidas a partir de bactérias têm se tornado largamente explorados por diversas razões: as

bactérias possuem uma taxa de crescimento mais elevada permitindo uma maior produção de enzimas recombinantes; as celulasas bacterianas por serem um complexo multienzimático, fornecem um aumento na função e sinergia; as bactérias habitam uma grande variedade de ambientes, podendo ser termofílicas, psicrofílicas, alcalófilas, acidófilas ou halofílicas, produzindo linhagens que são extremamente resistentes a ambientes estressantes. Essas linhagens podem produzir enzimas celulolíticas que se encontram estáveis sob condições extremas e que podem ser utilizadas em processos de bioconversão (MIRANDA et al., 2009).

Estudos envolvendo proteínas secretadas pelas espécies de *Bacillus* têm demonstrado que muitas delas, como *Bacillus cereus* (WENZEL et al., 2002), *Bacillus licheniformis* (LIU et al., 2004), *Bacillus subtilis* (DEUTSCHER et al., 2002) e *Bacillus polymyxa* (PAINBENI et al., 1992) são espécies produtoras de celulasas e, portanto, apresentam grande capacidade celulolítica. Ainda, o gênero *Streptomyces* destaca-se entre as actinobacterias por sua capacidade de produzir um grande número de enzimas de interesse industrial (PADILHA, 1998).

Em 2009, uma nova bactéria termófila celulolítica foi isolada de dejetos suínos e identificada como *Brevibacillus* sp. cepa JXL. Os estudos com esta cepa revelaram que a mesma apresentava a capacidade de utilização de um largo espectro de substratos, tais como celulose cristalina, carboximetilcelulose, xilana, celobiose, glicose e xilose como fonte de carbono. A enzima manteve cerca de 50% de sua atividade após uma hora a 100 °C, tornando-a altamente termoestável (LIANG et al., 2009).

Recentemente, novas celulasas têm sido isoladas de bactérias, apresentando atividade enzimática em diversas condições. VIKAS e colaboradores (2013) isolaram uma bactéria termófila celulolítica de solo de plantações de arroz, identificada como *Geobacillus stearothermophilus*, que apresentou celulasas com temperatura ótima a 50 °C e pH de 6,0. IRFAN e colaboradores (2012) isolaram uma celulase de uma bactéria identificada como *Cellulomonas* sp. ASN2, apresentando temperatura ótima

de atividade a 60 °C e pH em torno de 7,5. Em 2011, SARATELE e OH (2011) descobriram um celulase isolada de *Nocardiopsis sp.* KNU, com temperatura ótima a 40 °C e pH a 5,0. Cabe salientar que cada uma destas enzimas tem suas características específicas, as quais podem ser aplicadas nos mais diferentes segmentos da indústria.

3.5 Compostagem de resíduos orgânicos

A compostagem é um método comumente utilizado para transformar resíduos biodegradáveis em produtos finais úteis, tais como fertilizantes e biogás (PETERS et al., 2000; SARKAR et al., 2010; CHEN et al., 2012). O processo pode ser descrito como uma degradação acelerada de materiais orgânicos por uma população composta por diversos micro-organismos (CHEN et al., 2012), que através de suas atividades catalíticas, realizam a conversão biológica dos materiais (WEI et al., 2000).

A compostagem passa por duas fases distintas ao longo do processo. Na fase mesofílica, compostos facilmente degradáveis, ricos em energia como açúcares e proteínas, são abundantes e degradados por fungos, actinobactérias, além de outras bactérias, considerados decompositores primários. As influências mecânicas são pequenas e vermes, ácaros, centopeias e outros animais da mesofauna estão presentes, atuando principalmente como catalisadores. À medida que o material começa a ser degradado, a quantidade de micro-organismos mesófilos, principalmente bactérias produtoras de ácido láctico e leveduras, tende a aumentar (INSAM e BERTOLDI, 2007; HULTMAN, 2009;). O número de organismos mesófilos é três vezes maior que o número de organismos termófilos (INSAM e BERTOLDI, 2007). O incremento da atividade dessas bactérias produtoras de ácido causa a queda do pH, enquanto a temperatura, em contrapartida, começa a aumentar em resultado à vigorosa atividade microbiana exotérmica, alcançando em torno de 45 °C, dando início à fase termofílica, a qual micro-

organismos termófilos assumem o controle da degradação de nutrientes e aumentam o pH do meio (HULTMAN, 2009).

Organismos adaptados a altas temperaturas obtêm uma vantagem competitiva e, gradualmente, substituem a flora mesofílica, quase inteiramente até o final do processo. Organismos mesófilos morrem e são degradados por organismos termófilos, juntamente com o restante do substrato facilmente degradável. A decomposição continua rapidamente e acelera até atingir uma temperatura em torno de 62 °C. Temperaturas elevadas geralmente inibem o crescimento de fungos, e as bactérias termoloterantes e termofílicas permanecem ativas também em altas temperaturas. Apesar da destruição de muitos micro-organismos acima de 65 °C, a temperatura pode aumentar ainda mais, podendo exceder 80 °C. É provável que este aumento de temperatura não seja devido à atividade microbiana, mas sim a efeitos de reações abióticas exotérmicas em que enzimas estáveis a altas temperaturas podem estar envolvidas. A fase termofílica é importante para higienização do processo de compostagem. Nesta fase, patógenos humanos e de plantas são destruídos e ervas daninha e larvas de insetos são mortas. Além da temperatura elevada na fase termofílica, a presença de uma microbiota muito específica, composta principalmente de actinobacterias, é importante para higienização devido a produção de antibióticos muito comum por este grupo de micro-organismos (INSAM e BERTOLDI, 2007). Como resultado do início da depleção da matéria orgânica, a temperatura começa a decrescer, dando fim ao processo da compostagem (HASSEN et al., 2001).

Há muita expectativa no que se refere à contribuição dos micro-organismos no desenvolvimento de processos biotecnológicos, visto que um número muito restrito tem sido efetivamente explorado (BULL et al., 2000). O Brasil detém cerca de 20% de toda a diversidade microbiana mundial (SOUZA et al., 2001) sendo que parte dessa diversidade encontra-se concentrada na Mata Atlântica, e por consequência na Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP) e em sua compostagem, a qual

possui uma biomassa rica em resíduos orgânicos e pode ser considerada como verdadeira fonte de enzimas microbianas.

A FPZSP está localizada em uma área de 824.529 m² de Mata Atlântica nativa da região Sul da cidade de São Paulo. Aloja a nascente do riacho do Ipiranga e conta com um acervo de 4.000 animais silvestres, incluindo mega vertebrados como elefantes e hipopótamos. A compostagem de dejetos, restos de camas e resíduos alimentares dos recintos, resíduos vegetais como folhas, galhos e árvores caídas, instalada FPZSP, gera uma biomassa rica em resíduos orgânicos. Uma vez que o parque abriga diversos animais provenientes do mundo inteiro, esta compostagem pode ser considerada uma verdadeira fonte de biodiversidade microbiana e enzimas catalíticas provenientes dos microorganismos ali encontrados. Todo o processo de compostagem da FPZSP é realizado na Unidade de Produção de Composto Orgânico (UPCO) (CRUZ, 2004).

Dentre os principais gêneros de bactérias que comumente são encontrados em processos de compostagem, a prevalência do gênero *Bacillus* geralmente é observada devido à sua capacidade de produção de endósporos bacterianos que são altamente resistentes a temperaturas elevadas e a outras condições desfavoráveis que possam estar presentes em ambientes desse tipo (BLANC et al., 1999; DEES e GHIORSE, 2001; HASSEN et al., 2001, SILVA et al., 2009). Representantes do gênero *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, *Serratia*, *Escherichia*, *Proteus* e espécies da família *Enterobacteriaceae* (TAIWO e OSO, 2004; SILVA et al., 2009) também já foram encontrados em ambientes da compostagem.

Na fase termofílica, as actinobactérias tornam-se mais abundantes (RYCKEBOER et al., 2003), exercendo importante função na degradação de matéria orgânica devido à sua atividade proteolítica e às enzimas que degradam polímeros naturais as quais atuam na decomposição de queratinas, quitinas, amido e celulosas (MCCARTHY e WILLIAMS, 1992; HOLMALAHTI et al., 1994). Entre os gêneros

mais comumente encontrados destacam-se *Nocardia*, *Streptomyces*, *Thermoactinomyces*, *Thermomonosporas* e *Micromonospora* (LACEY, 1997; OLIVEIRA, 2003).

Micro-organismos termófilos podem ser sub-divididos de acordo com suas temperaturas de tolerância: termófilos facultativos podem crescer em temperaturas entre 50 °C e 65 °C, mas também crescem à 37 °C; termófilos obrigatórios têm um crescimento máximo entre 65 °C e 70 °C, e não crescem em temperaturas inferiores a 40 °C; termófilos extremos podem crescer entre 40 °C e 70 °C, com uma temperatura ótima de crescimento em torno de 65 °C; e hipertermófilos, principalmente Arqueias, podem crescer em temperaturas em torno de 90 °C com um crescimento ótimo entre 80 °C e 115 °C (KIKANI et al., 2010).

Com base neste contexto, o processo de compostagem pode representar um ambiente rico e ainda pouco explorado em relação à espécies de micro-organismos e suas enzimas, em especial as celulases que desempenham papel relevante neste ambiente e podem ser utilizadas em processos industriais para diversa aplicações.

3.6 Delineamento experimental

O sistema enzimático pode ser afetado por diferentes fatores, tanto derivados de aspectos físico-químicos como a temperatura e o pH, quanto derivados das ações de outros organismos (BAMFORTH e SINGLETON, 2005; D'SOUZA et al., 2006; DING et al., 2008, ALAM et al., 2009). Antes que um micro-organismo possa ser aplicado em processos industriais e biotecnológicos, fatores ambientais e nutricionais fundamentais que afetam a atividade enzimática nestes processos devem ser primeiramente estudados em laboratório. O método clássico, onde apenas uma variável é testada por vez em diferentes condições enquanto as demais permanecem fixas, é laboriosa e consome muito tempo, especialmente quando o número de variáveis é grande (PEREIRA et al., 2010). Este método negligencia possíveis

interações entre os fatores por não explorar completamente o espaço experimental. Em adição, experimentos com todas as combinações de variáveis são praticamente impossíveis de reproduzir levando em consideração principalmente o número de ensaios. Uma alternativa mais eficiente em sistemas microbianos é o uso de métodos estatísticos, que usam um número menor de medidas e explora todo o espaço experimental.

Inicialmente na metodologia do planejamento experimental quando se conhece pouco do processo, o ideal é utilizar metodologias de triagem das condições de cultivo, entre elas o planejamento fatorial fracionado e o planejamento do tipo Plackett-Burman (RODRIGUES e IEMMA, 2009). O planejamento Plackett-Burman (P&B) permite testar uma variedade grande de fatores com um menor número de ensaios, estimar a variabilidade de erros aleatórios e testar a significância estatística dos parâmetros (PLACKETT e BURMAN, 1946). Nesta primeira triagem recomenda-se avaliar o resultado e estimar os efeitos principais de acordo com um modelo linear, e as variáveis que obtiverem maiores influências no processo são selecionados para novos estudos e otimização, podendo então ser empregada a técnica conhecida por Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), que explora todo o espaço experimental. Esta técnica possibilita a avaliação dos efeitos de cada variável individualmente e de suas interações sobre uma dada resposta (RODRIGUES e IEMMA, 2009).

4 Material e métodos

4.1 Manutenção, preservação e reativação dos isolados

Os micro-organismos oriundos do processo de compostagem da FPZSP foram isolados e caracterizados morfológicamente de acordo com metodologia descrita por Ramos (2013), sendo mantidos criopreservados pelo método de ultracongelamento a -80°C pelo grupo de pesquisas do Laboratório Multidisciplinar em Saúde e Meio Ambiente da Universidade Federal de São Paulo, sob a

orientação da Profa. Dra. Suzan Pantaroto de Vasconcellos. Dentre as bactérias isoladas, 168 foram transferidas à Divisão de Recursos Microbianos – CPQBA/UNICAMP e testadas para uma triagem inicial quanto a produção de celulases.

4.2 Análise qualitativa da produção de celulases

Visando a triagem inicial das bactérias produtoras de celulase, foi realizado o ensaio qualitativo conforme a metodologia adaptada de THEATER e WOOD (1982). Dessa forma, uma ampola preservada de cada isolado foi descongelada e a suspensão de células homogeneizada. Uma alíquota de 100 μL foi transferida para um tubo de ensaio contendo 7,0 mL de meio caldo nutriente (Nutrient Broth, Oxoid) e incubado por 24 h a 45 °C e 150 rpm. Após o período de incubação, 100 μL de cada inóculo foram transferidos para uma placa *Deep Well* contendo 1,0 mL de meio caldo indutor de produção enzimática (0,2 g de NaNO_3 ; 0,1 g de K_2HPO_4 ; 0,05 g de MgSO_4 ; 0,05 g de KCl ; 0,2 g de CMC; 100 mL de água destilada) nos valores de pH 4,8 e 7,4. Tais valores de pH foram adotados visando o pH utilizado na produção de biocombustíveis (4,8) e o pH de isolamento dos micro-organismos estudados (7,4). A placa *Deep Well* foi incubada com agitação a 150 rpm, 45 °C por 24 h. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas durante 15 min a 4 °C a 3.000 rpm. Em seguida, 25 μL do sobrenadante foram transferidos para um canudo esterilizado de seis mm de comprimento disposto em uma placa de Petri contendo meio sólido com a seguinte formulação: 0,2 g de nitrato de sódio; 0,05 g de sulfato de magnésio; 0,1 g de fosfato de potássio monobásico; 0,05 g de cloreto de potássio; 1,7 g de ágar; 0,2 g de carboximetilcelulose e 100 mL de água destilada. Após 24 h de incubação a 45 °C, os canudos foram retirados e as placas foram coradas com o corante vermelho de Congo (1,0 mg/mL) por 15 min e lavadas com uma solução de NaCl 1 M. Os micro-organismos que apresentaram halos translúcidos ao redor das marcas deixadas pelos canudos devido a quebra do

carboximetilcelulose presente no meio de cultura foram considerados potencialmente celulolíticos e selecionados para ensaios posteriores. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4.3 Análise quantitativa da atividade celulolítica

A atividade celulolítica das linhagens selecionadas através do ensaio descrito no item 4.2 foi avaliada durante sete dias através de um sistema miniaturizado empregando microplacas de 96 poços, adaptado para o método *high-throughput screening* (HTS) a partir da metodologia descrita por XIAO e colaboradores (2004).

Inicialmente, os micro-organismos foram reativados em 10 mL de caldo nutriente (Nutrient Broth, Oxoid) e incubados a 45 °C por 48 h com agitação a 150 rpm. Após esse período, 4,0 mL do reativado foram transferidos para um tubo contendo 10 mL de caldo nutriente e incubado nas mesmas condições anteriores. Após o período de incubação, 100 µL do inoculo foram transferidos para uma placa *Deep Well* contendo 900 µL de meio de Mandels (2,0 g/L de KH_2PO_4 ; 1,4 g/L de NH_4SO_4 ; 0,3 g/L de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 0,3 g/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 5,0 mg/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 1,6 mg/L de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; 1,4 mg/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 2,0 mg/L de CoCl_2 ; 1,0 mL/L de Tween 80; 1,0 g/L de peptona) nos valores de pH 4,8 e 7,4 e um disco de papel de filtro utilizado como fonte de celulose, cortado com o auxílio de um furador de escritório resultando em discos de três mm de diâmetro. As placas foram montadas em sete replicatas e todas as amostras foram analisadas em triplicata. Todas as sete replicatas foram incubadas com agitação a 150 rpm e 45 °C e a cada 24 h uma placa foi utilizada para a medição da atividade enzimática até o final de sete dias.

Para a determinação da atividade enzimática, as placas foram primeiramente centrifugadas a 3.000 rpm a 4 °C durante 15 min. Um alíquota de 20 µL do sobrenadante foi transferida para uma microplaca de 96 poços de 0,2 mL contendo 40 µL de tampão acetato de sódio em pH 4,8 e fosfato de sódio em pH

7,4 e um disco de papel de filtro esterilizado. A placa foi então incubada em termociclador (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) a 50 °C por 60 min. Após este período, 120 µL de Reagente de Sumner (10 g/L de ácido 3,5 dinitro salicílico; 16 g/L de NaOH; 300 g/L de tartarato duplo de sódio e potássio) foram adicionados e a placa foi aquecida, novamente em termociclador, a 95 °C por 5 min e, em seguida, resfriada a 4 °C por 1 minuto. A reação foi homogeneizada e 36 µL foram transferidos para uma microplaca de 96 poços contendo 160 µL de água destilada. A absorbância foi medida em espectrofotômetro de placa a 540 nm e o valor da absorbância obtido em cada leitura foi utilizado na seguinte fórmula:

$$\text{FPU/mL} = \frac{(A_{540} \text{ amostra})}{(A_{540/\text{mg}} \text{ padrão})} \times (5,55 \mu\text{mole/mg}) \times \frac{1}{60 \text{ min}} \times \frac{1}{x\text{mL}}$$

Onde:

FPU/mL = determinação da atividade celulolítica na amostra diluída;

A_{540} amostra = absorbância obtida a partir das ensaios realizados nos pH 4,8 e 7,4;

$A_{540/\text{mg}} \text{ padrão}$ = absorbância para 1,0 mg de glicose obtida a partir da curva padrão de glicose

(Figura 4);

5,55 µmole/mg = número de µmoles de glicose em 1,0 mg;

60 min = tempo de incubação;

xmL = volume extrato enzimático em mL.

Uma unidade internacional (UI) de FPU (*Filter Paper Unity*) corresponde à quantidade de enzima capaz de liberar 1,0 µmol de açúcar redutor por minuto nas condições do teste (equivalente a 0,18 mg de glicose por minuto).

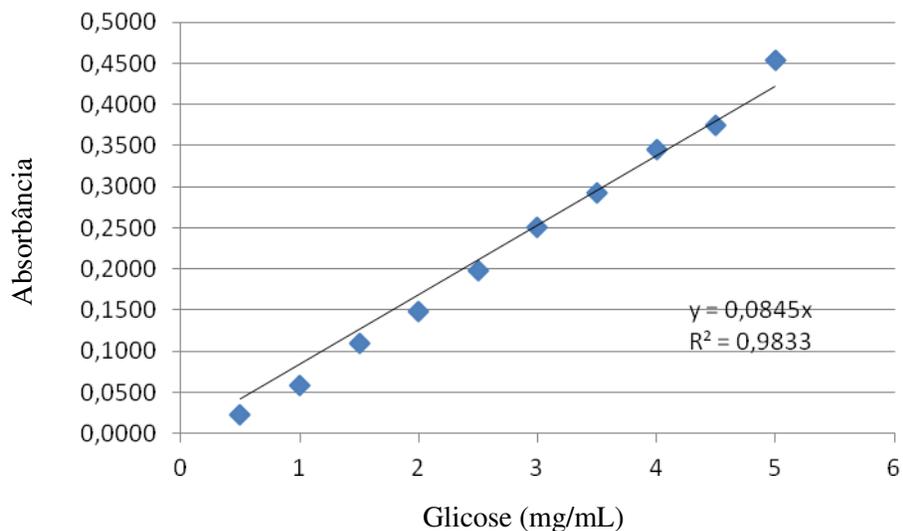


Figura 4. Curva padrão de glicose.

4.4 Delineamento experimental

4.4.1 Planejamento experimental do tipo Plackett-Burman (P&B)

De maneira a incrementar as atividades enzimáticas detectadas e quantificadas através dos ensaios descritos nos itens 4.2 e 4.3, optou-se pela aplicação de técnicas de delineamento experimental. Dessa forma, a partir dos resultados obtidos nos experimentos anteriores, cinco linhagens foram selecionadas, reativadas em meio caldo nutriente e após incubação a 45 °C por 48 h, 100 µL foram transferidas para placa *Deep Well* contendo um disco de papel de filtro esterilizado e 900 µL de meio líquido, preparado de acordo com composição descrita na matriz A (Tabela 1). Primeiramente, o meio líquido foi preparado em Erlenmeyers no volume de 50 mL e depois transferidos para a microplaca, que foi então incubada com agitação a 145 rpm a 45 °C por cinco dias. Após esse período, a atividade enzimática foi medida conforme descrito no item 4.3.

Tabela 1. Matriz A: Planejamento experimental Plackett-Burman (P&B) realizado com cinco linhagens selecionadas, as quais apresentaram os melhores índices de atividade enzimática após ensaio quantitativo.

	pH	KH ₂ PO ₄ (g/50mL)	(NH ₄)SO ₄ (g/50mL)	CaCl ₂ .H ₂ O (g/50mL)	MgSO ₄ .7H ₂ O (g/50mL)	FeSO ₄ .7H ₂ O (g/50mL)	MnSO ₄ .H ₂ O (g/50mL)	ZnSO ₄ .7H ₂ O (g/50mL)	CoCl ₂ (g/50mL)	Tween 80 (mL)	Peptona (g/50mL)	Ext Levedura (g/50mL)	H ₂ O (mL)
1	7,4 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0,03 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0,00014 (1)	0,0002 (1)	0 (-1)	0,075 (1)	0,025	49,83
2	7,4 (1)	0,2(1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0,0005 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0,0002 (1)	0,1 (1)	0,025 (-1)	0,075 (1)	49,65
3	7,4 (1)	0,2 (1)	0,14(1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0,00016 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0,1 (1)	0,075 (1)	0,025 (-1)	49,92
4	7,4 (1)	0,2 (1)	0,14 (1)	0,03 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0,00014 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0,075 (1)	0,075 (1)	49,93
5	4,8 (-1)	0,2 (1)	0,14 (1)	0,03 (1)	0,03 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0,0002 (1)	0 (-1)	0,025 (-1)	0,075 (1)	49,9
6	7,4 (1)	0 (-1)	0,14 (1)	0,03 (1)	0,03 (1)	0,0005 (1)	0(-1)	0 (-1)	0 (-1)	0,1 (1)	0,025	0,025 (-1)	49,75
7	4,8	0,2 (1)	0 (-1)	0,03 (1)	0,03 (1)	0,0005 (1)	0,00016 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0,075 (1)	0,025	49,67
8	7,4 (1)	0 (-1)	0,14 (1)	0 (-1)	0,03 (1)	0,0005 (1)	0,00016 (1)	0,00014 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0,025 (-1)	0,075 (1)	49,6
9	7,4 (1)	0,2 (1)	0 (-1)	0,03 (1)	0 (-1)	0,0005 (1)	0,00016 (1)	0,00014 (1)	0,0002 (1)	0 (-1)	0,025 (-1)	0,025 (-1)	49,5
10	4,8 (-1)	0,2 (1)	0,14 (1)	0 (-1)	0,03 (1)	0 (-1)	0,00016 (1)	0,00014 (1)	0,0002 (1)	0,1 (1)	0,025 (-1)	0,025 (-1)	49,75
11	4,8 (-1)	0 (-1)	0,14 (1)	0,03 (1)	0 (-1)	0,0005 (1)	0 (-1)	0,00014 (1)	0,0002 (1)	0,1 (1)	0,075 (1)	0,025 (-1)	49,58
12	7,4 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0,03 (1)	0,03 (1)	0 (-1)	0,00016 (1)	0 (-1)	0,0002 (1)	0,1 (1)	0,075 (1)	0,075 (1)	49,82
13	4,8 (-1)	0,2 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0,03 (1)	0,0005 (1)	0 (-1)	0,00014 (1)	0 (-1)	0,1 (1)	0,075 (1)	0,075 (1)	49,68
14	4,8 (-1)	0 (-1)	0,14 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0,0005 (1)	0,00016 (1)	0 (-1)	0,0002 (1)	0 (-1)	0,075 (1)	0,075 (1)	49,57
15	4,8 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0,03 (1)	0 (-1)	0 (-1)	0,00016 (1)	0,00014 (1)	0 (-1)	0,1 (1)	0,025 (-1)	0,075 (1)	49,85
16	4,8 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0 (-1)	0,025 (-1)	0,025 (-1)	50
17 (C)	6.1 (0)	0,1 (0)	0,07 (0)	0,015 (0)	0,015 (0)	0,00025 (0)	0,00008 (0)	0,00007 (0)	0,0001 (0)	0,05 (0)	0,05 (0)	0,05 (0)	49,75
18 (C)	6.1 (0)	0,1 (0)	0,07 (0)	0,015 (0)	0,015 (0)	0,00025 (0)	0,00008 (0)	0,00007 (0)	0,0001 (0)	0,05 (0)	0,05 (0)	0,05 (0)	49,75
19 (C)	6.1 (0)	0,1 (0)	0,07 (0)	0,015 (0)	0,015 (0)	0,00025 (0)	0,00008 (0)	0,00007 (0)	0,0001 (0)	0,05 (0)	0,05 (0)	0,05 (0)	49,75
20 neg	6.1 (0)	0,1 (0)	0,07 (0)	0,015 (0)	0,015 (0)	0,00025 (0)	0,00008 (0)	0,00007 (0)	0,0001 (0)	0,05 (0)	0,05 (0)	0,05 (0)	49,75

*Valores codificados em parênteses (Anexo 5)

Nesta primeira triagem o resultado foi avaliado através do *software* STATISTICA 7.0 e os efeitos principais de cada variável foram estimados (Anexo 2). As variáveis que obtiveram maiores influências, ou seja, que demonstraram afetar a atividade enzimática de alguma maneira foram selecionadas para novos estudos no Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). As variáveis não selecionadas (não significativas ao processo) foram fixadas de acordo com os resultados obtidos.

4.4.2 Planejamento experimental do tipo DCCR

Após o planejamento P&B as variáveis significativas foram selecionadas para a melhor atividade enzimática e utilizadas no planejamento experimental do tipo DCCR, visando o aumento da atividade enzimática. Os mesmos procedimentos descritos no item 4.4.1 foram realizados, porém o meio de cultura líquido foi preparado de acordo com a composição descrita pela matriz B (Tabela 2):

Tabela 2. Matriz B: Planejamento experimental do tipo DCCR.

Ensaio	MnSO₄.H₂O (g/50mL)	Tween 80 (mL)	Extrato de levedura (g/50mL)	H₂O (mL)
1	0,00018 (-1)	0,105 (-1)	0,085 (-1)	42,84
2	0,00025 (1)	0,105 (-1)	0,085 (-1)	42,81
3	0,00018 (-1)	0,120 (1)	0,085 (-1)	42,84
4	0,00025 (1)	0,120 (1)	0,085 (-1)	42,81
5	0,00018 (-1)	0,105 (-1)	0,115 (1)	41,34
6	0,00025 (1)	0,105 (-1)	0,115 (1)	41,31
7	0,00018 (-1)	0,120 (1)	0,115 (1)	41,34
8	0,00025 (1)	0,120 (1)	0,115 (1)	41,31
9	0,0001 (-1,68)	0,1125 (0)	0,100 (0)	42,10
10	0,00025 (1,68)	0,1125 (0)	0,100 (0)	42,06
11	0,000205 (0)	0,100 (-1,68)	0,100 (0)	42,08
12	0,000205 (0)	0,125 (1,68)	0,100 (0)	42,08
13	0,000205 (0)	0,1125 (0)	0,075 (-1,68)	43,33
14	0,000205 (0)	0,1125 (0)	0,125 (1,68)	40,83
15	0,000205 (0)	0,1125 (0)	0,100 (0)	42,08
16	0,000205 (0)	0,1125 (0)	0,100 (0)	42,08
17	0,000205 (0)	0,1125 (0)	0,100 (0)	42,08
Controle	0,000205 (0)	0,1125 (0)	0,100 (0)	42,08

*Valores codificados em parênteses (Anexo 6)

4.5 Validação do planejamento experimental do tipo DCCR

A partir dos resultados obtidos no planejamento experimental do tipo DCCR, a condição que permitiu a obtenção de melhor atividade enzimática foi selecionada, enquanto suas variáveis foram

repetidas em um novo experimento, sob as mesmas condições descritas no item 4.4.2, a fim de validar os resultados obtidos.

4.6 Identificação molecular das bactérias que apresentaram atividade celulolítica

4.6.1 Extração e quantificação do DNA genômico

Os isolados foram cultivados em 7,0 mL de meio caldo nutriente e incubados a 37 °C por 48 h. Após o crescimento microbiano, a biomassa gerada foi coletada por centrifugação a 12.000 rpm por 2 min, seguindo-se à subsequente extração do DNA genômico, segundo a metodologia descrita por VAN SOOLINGEN e colaboradores (1993) modificada. A biomassa celular recuperada por centrifugação foi lavada com 500 µL de TE 1X e centrifugada por mais 2 min a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e a biomassa foi suspensa com 400 µL de TE 1X. Adicionou-se 20 µL de lisozima (100 mg/mL) e após uma breve agitação, a suspensão foi incubada por 1 hora a 37 °C. Em seguida, 67,5 µL de SDS 10% e 4,0 µL de proteinase K (10 mg/mL) foram adicionados e incubados a 65 °C por 10 min. Após o período de incubação, 100 µL de NaCl 5M e 100 µL de solução CTAB/NaCl pré-aquecida a 65 °C foram adicionados e a suspensão agitada até que o líquido adquirisse um aspecto leitoso. A suspensão foi então incubada a 65 °C por mais 10 min. Posteriormente, foram adicionados 750 µL de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), homogeneizado vigorosamente em agitador rotativo por 10 seg e centrifugado a 12.000 rpm por 5 min. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de polipropileno e 0,6 volumes de álcool isopropanol foram adicionados para a precipitação do ácido nucléico. Os tubos de polipropileno foram então agitados por inversão, colocados a -20 °C por 60 min e, em seguida, centrifugados a 12000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado, o DNA lavado com 1 mL de etanol 70% gelado (-20 °C) e centrifugado por mais 5 min. Após secagem do precipitado em estufa a

28 °C, o DNA foi suspenso em 80 µL de água ultrapura esterilizada e 2 µL de RNase (10 mg/mL) foram adicionados. A suspensão foi então incubada a 37 °C por 30 min para a digestão do RNA.

O DNA extraído foi quantificado através da comparação do DNA λ (50 ng/µL) em diferentes concentrações (50 e 100 ng) em gel de agarose a 1% submetido à eletroforese por 35 min, em condição de 100 nV. Após sua quantificação, os DNA extraídos foram armazenados em microtubos de polipropileno e mantidos a temperatura de -20 °C para identificação molecular utilizando o gene RNA ribossomal 16S.

4.6.2 Amplificação do gene RNA ribossomal 16S de bactérias

A amplificação do gene RNA ribossomal 16S foi feita por meio de uma reação de polimerase em cadeia (PCR) utilizando os oligonucleotídeos p10f (5' GAG TTT GAT CCT GGC TCA G 3') e 1525r (5' AAG GAG GTG WTC CAR CC 3') (LANE et al., 1991), homólogos a regiões conservadas do gene RNA ribossomal 16S do Domínio Bacteria.

As condições de reação de amplificação foram: 2,5 µL de tampão 10X (sem Mg⁺²); 0,75 µL de MgCl₂ (2,5 mM); 0,2 µL de dNTPs (2,5 mM cada); 0,5 µL de cada primer (20 µM); DNA para uma concentração final de 50-100 ng; 0,2 U/µL de Taq DNA polimerase (Invitrogen); e água ultrapura esterilizada completando o volume para 25 µL de reação. Para a amplificação foi realizada uma desnaturação inicial de 95 °C por 2 min, seguida de 30 ciclos, sendo: 94 °C por 1 min, 55 °C por 1 min, 72 °C por 3 min, extensão final de 3 min a 72°C, em termociclador Eppendorf. A confirmação do tamanho dos produtos de PCR e sua quantificação foram obtidas através de eletroforese em gel de agarose 1%.

4.6.3 Sequenciamento e análise filogenética de gene RNA ribossomal 16S

Para o sequenciamento automatizado, os produtos de PCR foram purificados utilizando-se mini-colunas (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Health Care) e submetidos ao sequenciamento em sequenciador automático (ABI3500xL). As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit BigDye® Terminator v3.1 Sequencing Kit (Life Technologies). Os oligonucleotídeos utilizados na reação de sequenciamento foram: 10f (5' GAG TTT GAT CCT GGC TCA G 3'), p765f (5' ATT AGA TAC CCT GGT AG 3'), p782r (5' ACC AGG GTA TCT AAT CCT GT 3') e 1100r (5' AGG GTT GCG CTC GTT G 3').

As sequências obtidas no sequenciamento foram processadas no programa phred/Phrap/CONSED versão Linux (EWING et al., 1998; GORDON et al., 1998; GORDON, 2004) para a montagem dos contigs. A sequência com aproximadamente 1100 pb foi submetida à comparação nos bancos de dados, Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) e Ribosomal Data Project II 9.0 (<http://rdp.cme.msu.edu/index.jsp>). As sequências recuperadas dos bancos de dados foram alinhadas no programa CLUSTAL X (THOMPSON et al., 1997) e as análises filogenéticas foram conduzidas utilizando o programa MEGA versão 5 (TAMURA et al., 2011). A matriz de distância evolutiva foi calculada com o modelo de Kimura (KIMURA, 1980) e a construção da árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas foi feita pelo método de *Neighbor-Joining* (SAITOU e NEI, 1987), com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 re-amostragens (FELSENSTEIN, 1985).

5 Resultados e discussão

5.1 Análise qualitativa da produção de celulases

A análise qualitativa da produção de celulases a partir dos isolados de bactérias oriundas do processo de compostagem revelou que das 168 bactérias analisadas, 40 apresentaram formação de

halos translúcidos em resposta a atividade celulolítica devido a quebra da carboximetilcelulose presente no meio de cultura no pH 4,8; 30 no pH 7,4 e 65 em ambos os valores de pH (Figura 5), indicando um potencial celulolítico desses micro-organismos a ser explorado.

Bactérias positivas e seus respectivos valores de pH de crescimento

■ pH 7.4 ■ pH 4.8 ■ Ambos valores de pH

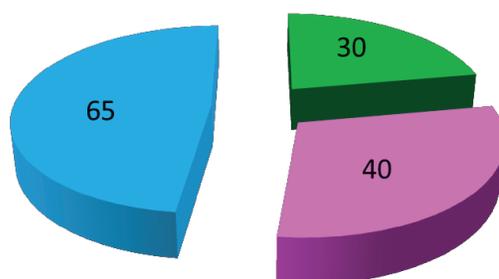


Figura 5: Número de bactérias produtoras de celulases distribuídas dentre as condições de pH avaliadas.

Dentre os isolados positivos, dez linhagens apresentaram halos translúcidos com diâmetros maiores (entre 1,3 cm e 1,9 cm) e bem visíveis quando comparados com os demais (Figura 6), portanto, foram selecionados para o ensaio seguinte.

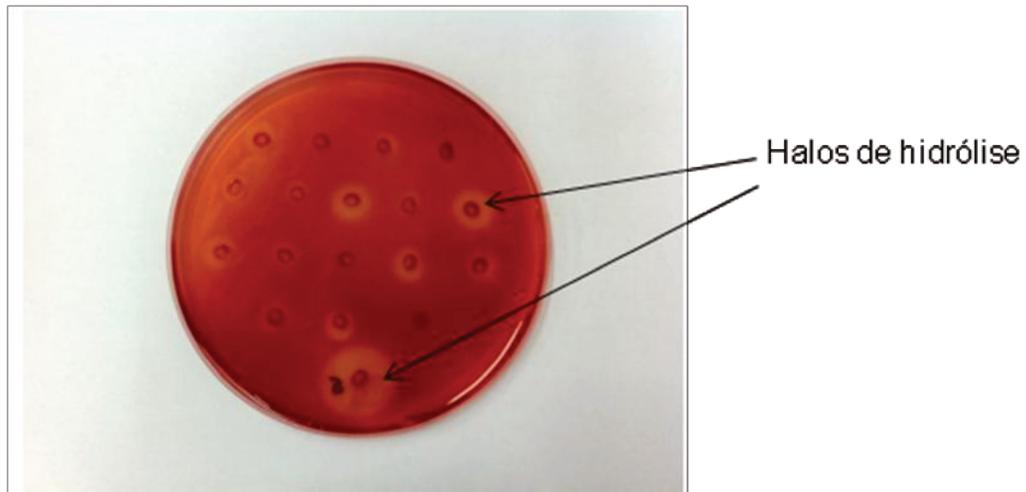


Figura 6. Halos translúcidos produzidos pelas linhagens em resposta a atividade celulolítica.

5.2 Análise quantitativa da atividade enzimática

Visando obter detalhes acerca do melhor período de tempo de incubação para a detecção e quantificação da atividade celulolítica dos isolados bacterianos selecionados, os ensaios quantitativos com as dez linhagens selecionadas no ensaio qualitativo foram monitorados durante sete dias, em duas condições referentes ao pH do meio reacional, ou seja, pH 4,8 e pH 7,4.

As Tabelas 3 e 4 apresentam os resultados obtidos frente às duas condições de pH avaliadas.

Tabela 3. Valores em FPU/mL da atividade celulolítica em pH 4,8 das dez linhagens monitoradas durante sete dias de ensaio.

pH 4,8	Valores de FPU/mL da atividade enzimática						
Linhagens	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
FPZSP 34	0	2,0881	0	0	0	0	1,1634
FPZSP 37	0	0,0398	0	0	0	0	2,9631
FPZSP 60	0	0	0	0	0	0	0
FPZSP 143	0	0	0	0	0	0,7656	2,3367
FPZSP 220	0	2,6946	0	0	0	0,6960	1,0739
FPZSP 230	0	0,1591	0	0	0	0,9943	1,1733
FPZSP 242	0	0,8154	0	0	0	0	0,3679
FPZSP 245	0,6662	1,1534	0	0	0	2,1378	0,8551
FPZSP 283	0,3281	1,7301	0	0	0	0,2585	1,0341
FPZSP 347	0	0,5568	0	0	0	0	1,2230

Tabela 4. Valores em FPU/mL da atividade celulolítica em pH 7,4 das 10 linhagens monitoradas durante sete dias de ensaio.

pH 7,4	Valores de FPU/mL da atividade enzimática						
Linhagens	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
FPZSP 34	1,0938	0	0	0,5071	1,6854	0	0
FPZSP 37	0,5668	0	0	2,2174	2,3317	0,5071	0
FPZSP 60	0,7358	0	0,2585	0,5369	1,5661	0	0
FPZSP 143	2,3267	0	0	1,0639	2,2323	0,3778	0
FPZSP 220	1,2628	0	0	0	0,1243	0	0,1690
FPZSP 230	1,4020	0	0	0,7358	6,8062	0	0
FPZSP 242	1,3225	0	0	0,0597	0,9198	1,3722	0,3580
FPZSP 245	3,4603	0	0	1,4915	0	0	0
FPZSP 283	0	0	0	0,2188	0,4524	0,6364	0
FPZSP 347	0,6861	0	0,3580	5,2699	2,6201	1,5611	0

Comparando os resultados obtidos nos dois valores de pH, não foi possível observar um padrão de produção enzimática das linhagens selecionadas. Porém, uma análise geral dos resultados de atividade celulolítica em pH 4,8, indicados na Tabela 3, mostraram que os maiores valores de FPU/mL da atividade enzimática das linhagens avaliadas foram no segundo e sétimo dias. No segundo dia de incubação, oito das dez linhagens testadas apresentaram atividade enzimática, enquanto que no sétimo dia, foram nove as linhagens com atividade celulolítica. A linhagem FPZSP 60 não apresentou atividade celulolítica em nenhum dos dias avaliados. Embora em ambos os dias tenham sido observados valores máximos de atividade para quatro linhagens, no sétimo dia a maioria dos demais

valores obtidos foram acima de 1,0 FPU/mL, diferentemente dos valores obtidos no segundo dia de incubação. Desta maneira, para o pH 4,8 foram fixados 7 dias de incubação para os ensaios quantitativos.

Para o pH 7,4, através dos dados observados na Tabela 4, é possível verificar que no primeiro, no quarto e no quinto dia de incubação a maioria das linhagens apresentaram atividade enzimática. Embora nos três dias tenham sido observados valores máximos de atividade, foi no quinto dia que a maioria das linhagens obteve este resultado, sendo, portanto, fixado em cinco dias de tempo de incubação para o pH 7,4.

Após a verificação do melhor tempo de incubação, foram selecionadas cinco linhagens para dar continuidade aos experimentos. As linhagens FPZSP 34, 37, 143, 230 e 347 foram selecionadas para os ensaios de delineamento experimental e otimização das atividades enzimáticas.

5.3 Caracterização taxonômica

A identificação taxonômica das cinco linhagens selecionadas quanto à atividade celulolítica quantificada através dos ensaios enzimáticos, foi realizada. Após análises moleculares baseadas em metodologias para a identificação do gene RNA ribossomal 16S, obteve-se que todas as linhagens pertenciam ao gênero *Bacillus* sp. (Figura 7). É sabido que linhagens do gênero têm alta similaridade de sequências do gene RNA ribossomal 16S e, portanto, este gene tem baixa resolução para distinção entre espécies de *Bacillus*. As linhagens FPZSP 230 e 347 agruparam com a espécie tipo *Bacillus subtilis*, e as linhagens FPZSP 34 e 143 agruparam com a espécie tipo *B. tequilensis*, enquanto a linhagem FPZSP 37 não agrupou com as linhagens presentes na análise. Cabe salientar que os valores de *bootstrap* apresentados na análise ficaram abaixo de 70 % e, portanto, dados complementares futuros devem ser aplicados para identificação em nível de espécie.

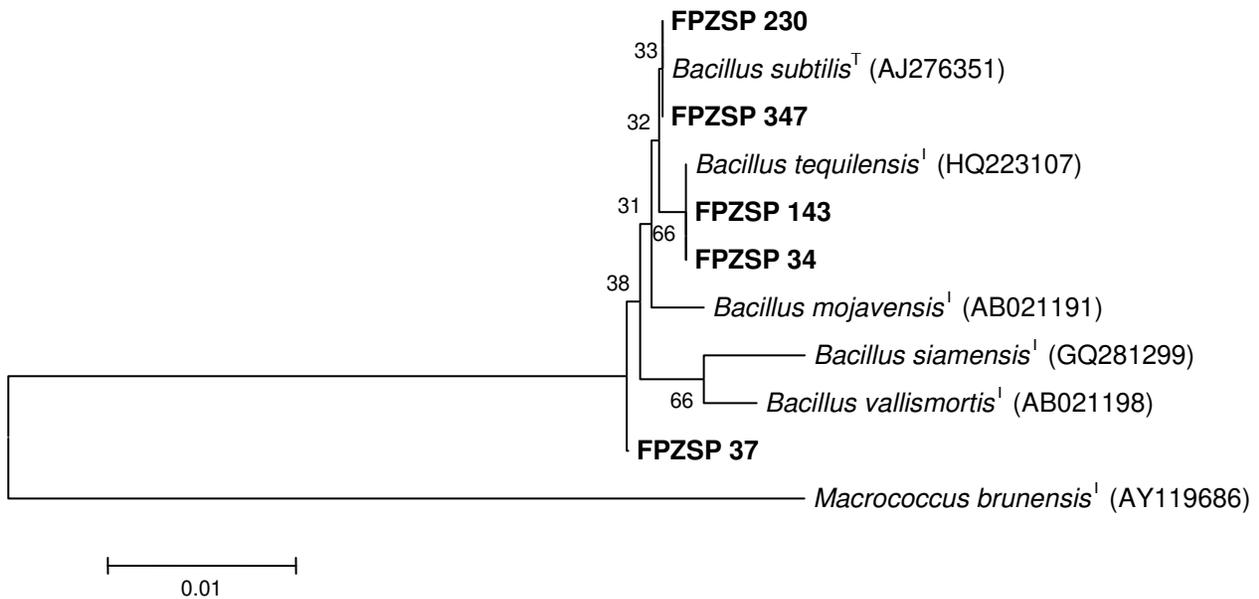


Figura 7. Árvore filogenética construída a partir de seqüências do gene RNA ribossomal 16S das linhagens produtoras de enzimas celulolíticas, utilizando-se o método Neighbor-Joining. A seqüência de *Macrocooccus brunensis*^T (AY119686) foi utilizada como grupo externo. Os números de cada um dos ramos são porcentagens de ocorrência dos grupamentos com base em análise de *bootstrap* de 1000 repetições. A barra indica 1 % de diferença das seqüências.

As bactérias do gênero *Bacillus* têm sido largamente reportadas como micro-organismos celulolíticos (ROBSON e CHAMBLISS, 1984; FUKUMORI et al., 1985; KAWAI et al., 1988; ABOU-TALEB et al., 2009). *Bacillus subtilis*, *B. megaterium* e *B. amyloliquefaciens* isolados de solo, *Bacillus pumilis* isolados da biomassa em decomposição, *Paenibacillus polymyxa* e *Brevibacillus* sp. isolados a partir de compostagens estão entre as espécies estudadas para a produção de celulase (LYND et al., 2002; LEE et al., 2008; TAMARU et al., 2010).

5.4 Análise do delineamento experimental

5.4.1 Planejamento experimental do tipo Plackett-Burman (P&B)

Toda análise e acompanhamento do delineamento experimental foram realizados em colaboração com a Dra Rafaella Costa Bonugli Santos, pesquisadora colaboradora do CPQBA/Unicamp.

O planejamento do tipo Plackett-Burman foi utilizado visando-se avaliar as condições do meio de cultivo, permitindo o conhecimento do processo enzimático em relação aos fatores físicos e químicos que podem resultar em um possível aumento da atividade enzimática. Neste primeiro planejamento diferentes concentrações dos componentes do meio de Mandels (Anexo 1) utilizados nos ensaios tanto de triagem bem como quantificação da atividade enzimática celulolítica, foram avaliadas. Em adição, a aferição da atividade enzimática foi realizada em três diferentes condições de pH, conforme os valores utilizados no planejamento, permitindo assim a detecção de possíveis diferenças na atividade em relação não só ao pH do meio para o crescimento bacteriano, mas também para o pH de leitura para avaliação da atividade enzimática. Neste planejamento, os ensaios mais relevantes para cada uma das linhagens selecionadas, encontram-se descritos pela Tabela 5. A tabela detalhada contendo todos os resultados obtidos para todos os ensaios realizados encontra-se apresentada no Anexo 3.

Tabela 5. Valores do pH de leitura, pH de crescimento e atividade enzimática dos ensaios mais relevantes após a aplicação do planejamento do tipo Plackett-Burman.

Linhagens	pH de leitura	pH de crescimento (matriz)	Ensaio relevante	Atividade celulolítica (FPU/mL)
FPZSP 34	7,4	7,4	12	2,9532
FPZSP 37	7,4	7,4	12	2,7941
FPZSP 143	6,1	4,8	15	3,6392
FPZSP 230	6,1	7,4	12	3,6492
FPZSP 347	6,1	7,4	2	2,5455

Conforme pode-se observar, a atividade enzimática das cinco linhagens avaliadas apresentaram valores em torno de 3,0 FPU/mL. *Trichoderma reesei* é o fungo mais comumente utilizado para produção de celulase (JUHASZ et al., 2005) e segundo Zambare e colaboradores (2011), após incubação por sete dias deste fungo, utilizando-se palha de milho pré-tratada no vapor como substrato, foi detectada uma atividade enzimática de 1,2 FPU/mL. Já pesquisas envolvendo a fermentação de *Laminaria japonica* em diferentes temperaturas verificou que a atividade celulolítica de diferentes bactérias anaeróbias teve como melhor atividade 0,19 FPU/mL a 35°C (SHI, et al., 2013) e segundo Ramos (2013), a atividade celulolítica de bactérias isoladas do trato gastrointestinal e do processo de compostagem de restos orgânicos de hipopótamo, a maioria pertencente ao gênero *Bacillus*, teve em média valores de até 12,8 FPU/mL. Em um estudo envolvendo 300 bactérias isoladas de diversos ambientes extremos, 20 foram selecionadas para análise quantitativa da atividade celulolítica, a maioria pertencente ao gênero *Bacillus*, *Paenibacillus* e *Lysinibacillus*. Dentre essas 20, a que obteve o melhor resultado de atividade enzimática, com valores em torno de 0,45 FPU/mL, foi um representante do gênero *Bacillus*, isolado e descrito recentemente a partir de solos ácidos (PANDEY et al., 2013). E, de

acordo com Amore e colaboradores (2013), 90 bactérias isoladas a partir de um processo de compostagem foram analisadas quanto às suas atividades celulolíticas. A bactéria que expressou a melhor atividade celulolítica foi *B. amyloliquefaciens* B31C, apresentando o valor de 0,11 U/mL.

Dados da literatura revelam que a atividade celulolítica de bactérias pode variar em grande escala de uma linhagem para outra, tornando-se difícil a comparação entre elas. Além disso, na maioria dos casos a fórmula aplicada para determinação da atividade celulolítica não se encontra claramente descrita. Entretanto, a literatura revela que o gênero *Bacillus* é comumente apontado como um dos maiores produtores de celulase, apresentando também, no geral, as melhores atividades enzimáticas quando comparadas com outras espécies de bactérias, da mesma forma que observado neste trabalho.

De acordo com a análise estatística (Anexo 2), as linhagens FPZSP 34 e FPZSP 347 não apresentaram nenhuma variável significativa, ou seja, nenhuma variável, na faixa estudada, influenciou na produção da atividade enzimática. Cabe ressaltar que estatisticamente variáveis significativas são aquelas que apresentaram *p-value* igual ou menor que o nível de significância estabelecido *a priori* pelo pesquisador, que no estudo em questão foi adotado como 0,1 (RODRIGUES e IEMMA, 2009). Uma avaliação geral da análise dos efeitos das linhagens avaliadas (Anexo 2) permitiu detectar que as principais variáveis significativas foram o pH e concentrações de MgSO₄, FeSO₄ e CoCl₂, a maioria com efeito positivo, ou seja, para uma melhor produção da enzima com atividade celulolítica, a concentração utilizada de tais variáveis deverá ser aumentada.

A análise mostrou que, no geral, a condição em pH 4,8 não resultou em atividade celulolítica bacteriana eficiente. Em contrapartida, quando em pH 6,1 e 7,4, a maioria das linhagens apresentou resultados promissores. Em relação ao pH de crescimento (matriz experimental, Tabela 1), de acordo com a análise estatística realizada, as melhores atividades foram obtidas no pH 7,4. Contudo, a linhagem FPZSP 143 apresentou também eficiência em pH 4,8. Dessa forma, tais resultados demonstram que, embora tal bactéria tenha sido isolada de um ambiente com pH em torno de 7,4, há

potencial para a produção de celulases, mesmo quando em faixas de pH mais ácidas, o que torna tal linhagem mais interessante sob o ponto de vista industrial, principalmente no que tange à produção de bioetanol de segunda geração, a qual pode ser conduzida pela hidrólise enzimática da celulose em condições de pH em torno de 4,8 (SILVA, 2010).

Além de atividades eficientes quando em pH 4,8, estatisticamente a linhagem FPZSP 143 apresentou como variáveis significativas $MgSO_4$, $FeSO_4$ e $CoCl_2$, quando em pH 6,1. Conforme o gráfico de Pareto desta linhagem (Figura 7), todas as variáveis significativas mostraram efeito negativo no processo, podendo ser removidas ou ter suas concentrações reduzidas para melhores atividades.

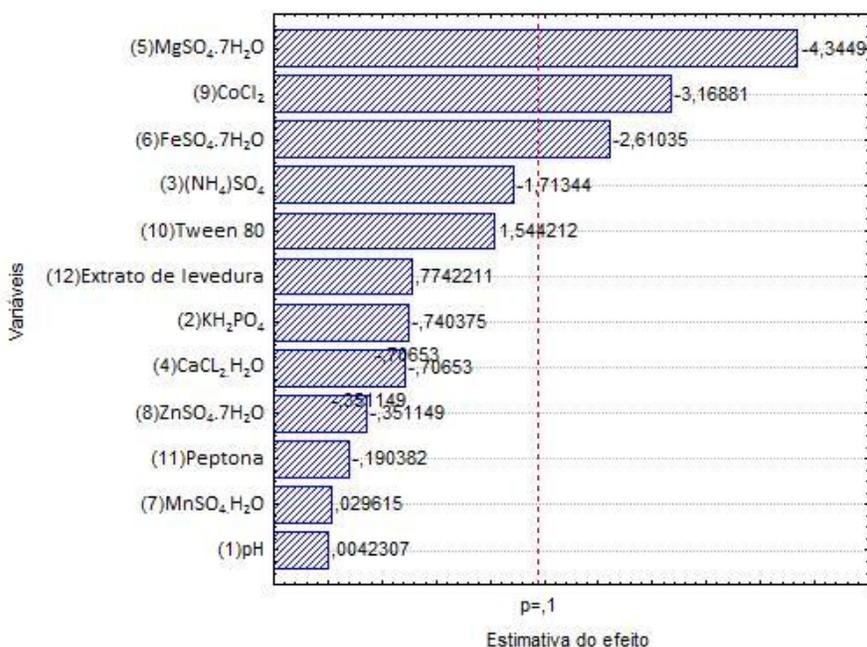


Figura 8. Efeito estatisticamente significativo ($p < 0,1$) de 12 variáveis na produção de celulases pela linhagem FPZSP 143.

Os íons metálicos presentes nos sais adicionados ao meio de cultivo influenciaram na atividade celulolítica através de sua ativação. Para serem ativas, algumas enzimas requerem apenas seus resíduos

de aminoácidos. Outras requerem elementos químicos adicionais denominados cofatores, que podem ser os íons metálicos, tais como Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , ou uma molécula orgânica. No entanto, alguns poucos íons metálicos podem agir como inibidores de celulases. As informações de inibição química de celulases são difusas e tendem a ser confusas e contraditórias. Os metais acima descritos podem ser tanto inibitórios ou estimulantes em algumas preparações, pois diferentes celulases demonstram diferentes susceptibilidades para a inibição, dependendo de suas características individuais (MANDELS e REESE, 1965).

Diante do exposto, o pH, assim como os íons metálicos, também podem afetar a função das enzimas. Através da variação dos grupos ionizados contidos em aminoácidos do sítio ativo, da modificação da conformação da enzima ou da alteração do substrato, a atividade enzimática pode ser alterada ou mesmo inativada. As enzimas possuem grupos químicos ionizáveis (carboxilas $-\text{COOH}$, amino $-\text{NH}_2$, tiol $-\text{SH}$, imidazol, etc) nas cadeias laterais de seus aminoácidos e, de acordo com o pH do meio, estes grupos podem ter carga elétrica positiva, negativa ou neutra. Como a conformação das proteínas depende, em parte, de suas cargas elétricas, haverá um pH no qual a conformação será a mais adequada para a atividade catalítica. Este é o chamado pH ótimo. Ligeiras mudanças de pH podem provocar a desnaturação da proteína e sua consequente perda de função (JÚNIOR, 2002).

Assim, de acordo com os resultados observados, a linhagem FPZSP 143 foi selecionada para dar continuidade aos experimentos, visto que dentre as cinco linhagens avaliadas, foi a que apresentou a melhor atividade enzimática (com aumento de 1,3025 FPU/mL, em relação ao experimento anterior, sem planejamento experimental), halos de maior diâmetro quando comparado com as outras linhagens estudadas (entre 1,3 cm e 1,8 cm) e crescimento no pH mais adequado para a maioria dos processos industriais utilizando enzimas celulolíticas, ou seja, pH 4,8.

A linhagem FPZSP 230, embora não tenha sido selecionada por apresentar halos de hidrólise menores (1,3 cm) e baixa atividade celulolítica em pH ácido, apresentou uma boa atividade celulolítica em pH mais básico, tornando-a atraente para estudos posteriores.

5.4.2 Planejamento experimental do tipo DCCR

No planejamento do tipo Delineamento Composto Central Rotacional – DCCR, visando a otimização da atividade celulolítica e a elucidação dos efeitos dos componentes físicos e químicos do meio de cultura na atividade desta enzima, os efeitos das variáveis do P&B da linhagem selecionada, FPZSP 143, foram considerados (Figura 8), sendo que novos valores foram delimitados levando em consideração o ensaio com maior atividade enzimática (ensaio 15 da Tabela 1). Neste sentido, as variáveis não significativas KH_2PO_4 , $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ e peptona foram eliminadas, uma vez que não estavam presentes no ensaio 15. O pH e as concentrações de ZnSO_4 e CaCl_2 foram fixadas em 4,8, 0,00014 g/50 mL e 0,03 g/50 mL, respectivamente. As variáveis significativas FeSO_4 , MgSO_4 e CoCl_2 também foram eliminadas, uma vez que o efeito foi negativo e não estavam presentes no ensaio 15. As variáveis MnSO_4 , tween e extrato de levedura apesar de não significativas estavam presentes no meio de cultivo do ensaio 15 e foram as únicas que apresentaram efeito positivo (Anexo 2), sendo então selecionadas para estudo em nova faixa de concentração, uma vez que na análise estatística o efeito pode não ser significativo, pois a faixa ideal da variável não foi estudada (RODRIGUES e IEMMA, 2009).

Quando novas concentrações de MnSO_4 , tween e extrato de levedura (Anexo 4) foram utilizadas não houve uma melhora significativa na atividade enzimática (Tabela 7), embora um pequeno aumento tenha sido notado no ensaio 10 para o pH de leitura 6,1 (0,4574 FPU/mL de aumento em relação ao experimento do planejamento P&B). Neste ensaio além do pH de leitura 6,1, identificado como ideal no P&B, as leituras da atividade enzimática foram realizadas também nos valores de pH 5,5 e 5,0, a fim

de verificar se o micro-organismo mantém a atividade de sua enzima em pH mais baixo. Assim, foi possível verificar que em pH abaixo de 6,1, não há melhora na atividade da enzima produzida por este micro-organismo.

Tabela 6. Valores do pH de leitura e atividade enzimática (FPU/mL) dos ensaios mais relevantes após a aplicação do planejamento do tipo DCCR.

Linhagem FPZSP 143	pH de leitura		
	6.1	5.5	5.0
Ensaio			
1	1,4617	0	0
2	0,4574	0	0
3	1,5909	0	0,7557
4	0,3977	0	0
5	0,8154	0	0,2088
6	1,4716	0	0
7	1,6009	0	0
8	0,4176	0	0
9	2,6747	0	0,6165
10	4,0966	0	0
11	2,5853	0	0,3878
12	2,0980	1,0242	0,4773
13	1,1833	0	0,2088
14	0	0	0
15	0,2188	0,2088	0
16	0,3679	2,7543	0
17	0,9048	0	0

Apesar do tímido aumento da atividade enzimática, o ensaio foi de grande importância para o entendimento da produção da enzima pela bactéria selecionada. De acordo com o coeficiente de regressão, Tabela 7, a única variável significativa foi $MnSO_4$ (quadrática), resultando em um aumento de aproximadamente 0,76 FPU/ml, valor semelhante ao aumento da produção em relação ao P&B e este DCCR. O aumento da concentração de tween e extrato de levedura não influenciaram a produção

da enzima. Neste sentido, podemos concluir que possivelmente a concentração MnSO_4 entre as 12 variáveis avaliadas é que apresenta maior importância na produção de celulase pela linhagem estudada.

Tal resultado demonstra que o íon Mn^{2+} influenciou a atividade da enzima, de maneira a estimular sua função. Além de desempenhar uma importante função como constituinte de enzimas e cofatores, segundo Song e colaboradores (2013) ao adicionar o íon metálico Mn^{2+} ao meio de crescimento utilizando palha de milho como substrato, houve uma melhora na hidrólise enzimática de fungos com um aumento de 61,39% na produção de glicose e 83,39% na produção de etanol. Ainda, de acordo com Sharma e colaboradores (2012), tal íon demonstrou efeitos positivos em linhagens mutantes de *B. coagulans* C11 e *G. stearothermophilus* S18, aumentando suas atividades.

Tabela 7. Coeficientes de regressão gerados a partir dos resultados obtidos da produção de FPU pela linhagem 143 no DCCR.

Variáveis	Coefficiente de regressão	Erro padrão	t(7)	p-value
Média	0,575895	0,598200	0,962713	0,367761
MnSO4.H2O(L)	-0,024602	0,281084	-0,087524	0,932706
MnSO4.H2O(Q)	0,759938	0,309664	2,454073	0,043845*
Tween 80(L)	-0,074563	0,281084	-0,265270	0,798444
Tween 80(Q)	0,390024	0,309664	1,259506	0,248217
Extrato de levedura(L)	-0,116538	0,281084	-0,414601	0,690845
Extrato de levedura(Q)	-0,230023	0,309664	-0,742816	0,481772
Interação MnSO4.H2O com Tween 80	-0,253554	0,367092	-0,690710	0,511993
Interação MnSO4.H2O com Extrato de levedura	0,208809	0,367092	0,568820	0,587256
Interação Tween 80 com Extrato de levedura	-0,042259	0,367092	-0,115118	0,911584

* p < 0,1

Assim, baseando-se nos resultados de coeficiente de regressão (Tabela 7) um modelo de segunda ordem para a atividade de FPU em função do $MnSO_4$ foi estabelecido:

$$FPU/mL = 0,575895 + 0,7599382 MnSO_4$$

A significância estatística (Tabela 8) foi confirmada pelo teste F (Anova). Entretanto, o valor do teste F (8,6) para a regressão foi significativo [maior que o F tabelado (3,07)], mas a porcentagem de variação explicada pelo modelo não foi adequado ($R^2 = 36\%$).

Tabela 8. Anova do modelo quadrático para a produção de FPU pela linhagem 143.

Fonte de Variação	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Quadrado médio	F calculado
Regressão	6,80	1	6,8	8,600337
Resíduo	11,86	15	0,790667	
Total	18,66	16	1,16625	

$R^2 = 36\%$ e p-valor = 0.0001

F 1;15;0,1 (F tabelado) = 3,07

O baixo coeficiente de regressão obtido ($R^2 = 0,36$) é um indício de que os níveis das concentrações de $MnSO_4$ utilizados não foram amplos o suficiente para a detecção de grandes variações na atividade da enzima. Visando a correta interpretação dos dados estatísticos o modelo não pôde ser considerado previsível e, portanto, não foi usado para gerar um gráfico de contorno e superfície de resposta, o qual poderia mostrar se houve ou não a otimização do experimento. Apesar deste resultado, o planejamento experimental pôde ser considerado válido, uma vez que aumentou a atividade celulolítica de 2,3367 FPU/mL (antes da realização do P&B) para 4,0966 FPU/mL (após

DCCR). Assim, com base nos resultados obtidos, a maior atividade detectada, apresentada pelo Ensaio 10, foi selecionada para validação do experimento e estudos complementares.

5.5 Validação

Para validar o modelo descrito, ou seja, Ensaio 10 do planejamento DCCR, novo experimento foi conduzido utilizando-se a mesma composição do meio de cultivo de tal ensaio. A atividade celulolítica observada foi de 4,6435 FPU/mL. Sob essas mesmas condições, o ensaio anterior resultou em uma atividade enzimática de 4,0966 FPU/mL. Assim, uma excelente correlação entre os dois experimentos foi observada, confirmando assim a validade da condição estabelecida.

5.6 Evolução da atividade celulolítica

Durante o desenvolvimento do projeto foi possível verificar um aumento significativo da atividade celulolítica da linhagem selecionada, FPZSP 143. Este resultado pode ser observado pela Figura 9, onde é possível constatar o aumento da atividade da enzima ao longo dos ensaios de otimização.

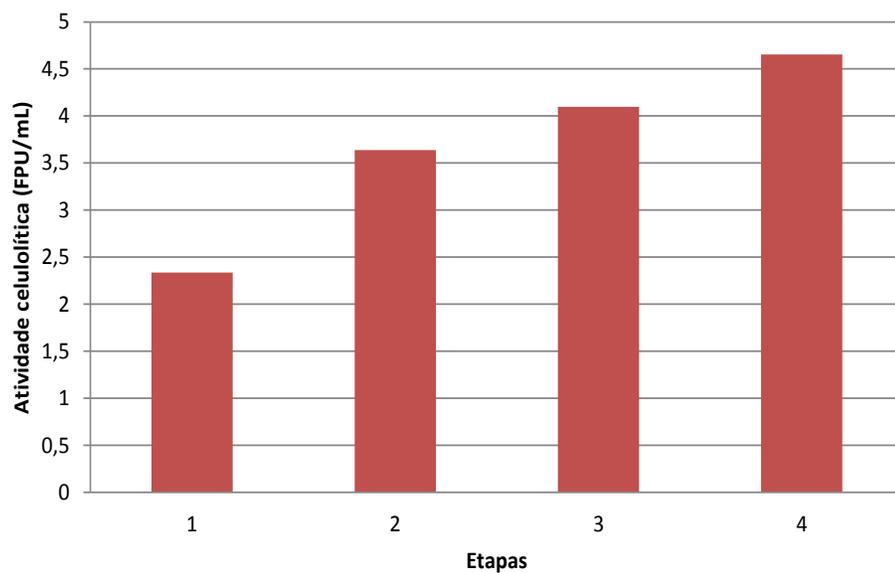


Figura 9. Evolução da atividade celulolítica pela linhagem FPZSP 143. 1-Seleção do tempo de incubação; 2-Planejamento P&B; 3-Planejamento DCCR; 4-Validação do planejamento DCCR.

6 Conclusões

De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que:

- O ambiente da compostagem é favorável às bactérias com potencial celulolítico;
- Embora as bactérias tenham sido isoladas de um ambiente com pH em torno dos 7,4, há potencial para a produção de celulasas em pH mais ácidos;
- A linhagem selecionada FPZSP 143, identificada como *Bacillus* sp., teve sua atividade celulolítica aumenta após as análises e aplicação de planejamento experimental;
- A melhor condição do meio de cultivo para o crescimento e atividade celulolítica da linhagem selecionada FPZSP 143 foi com a seguinte formulação: 0,00025 g/50mL de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0,1125 mL/50mL de Tween 80 e 0,100 g/50mL de extrato de levedura, em pH 4,8;
- Representantes do gênero *Bacillus*, no ambiente da compostagem, possivelmente são os melhores produtores de enzimas celulolíticas, o qual pôde ser demonstrado pela amostragem realizada no presente estudo e análises realizadas.

7 Referências bibliográficas

- ABOU-TALEB, K.A.A., MASHHOOR, W.A., NASR, S.A., SHARAF, M.S., ABDEL-AZEEM, H.H.M. Nutritional and environmental factors affecting cellulase production by two strains of cellulolytic bacilli. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3: 2429–2436, 2009.
- ALAM, Z., MANSOR, M.F., JALAL, K.C.A. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white-rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation*, 19: 771-783, 2009.
- ALBRECHT, R., PÉRISSOL, C., RUAUDEL, F., LE PETIT, J., TERROM, G. Functional changes in culturable microbial communities during a co-composting process: carbon source utilization and co-metabolism. *Waste Management*, 30: 764-770, 2009.
- AMORE, A., PEPE, O., VENTORINO, V., BIROLO, L., GIANGRANDE, C., FARACO, V. Industrial waste based compost as a source of novel cellulolytic strains and enzymes. *Microbiology Letters*, 339: 93-101, 2013.
- AULIN, C. Novel oil resistant cellulosic materials. Doctoral thesis in Pulp and Paper Technology, Royal Institute of Technology, 2009.
- AZIZI SAMIR, M. A. S., ALLOIN, F., DUFRESNE, A. Review of recent research into cellulosic whiskers, their properties and their application in nanocomposite field. *Biomacromolecules*, 6: 612–626, 2005.
- BALAT, M. E BALAT, H. Recent trends in global production and utilization of bioethanol fuel. *Applied Energy*, 86: 2273-2282, 2009.
- BAMFORTH, S.M. E SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 80: 723-736, 2005.
- BELITZ, H.D., GROSCH, W., SCHIEBERLE, P. Springer Food chemistry 4th revised and extended edition. *Annual Review Biochemistry*, 79:655–681, 2009.
- BERGQVIST, S.W., SANDBERG, A.S., CARLSSON, N.G., ANDLID, T. Improved iron solubility in carrot juice fermented by homo- and hetero-fermentative lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 22:53–61, 2005.
- BHAT, M.K. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnology Advances*, 18:355–383, 2000.
- BHAT, M.K., BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. *Biotechnology Advances*, 15: 583-620, 1997.
- BLANC, M., MARILLEY, L., BEFFA, T., ARAGNO, M. Thermophilic bacterial communities in hot composts as revealed by most probable number counts and molecular (16 rDNA) methods. *Microbiology Ecology*, 28: 141-149, 1999.

- BORTOLAZZO, N.G. Isolamento e seleção de fungos celulolíticos para hidrólise enzimática do bagaço de cana-de-açúcar. Dissertação de mestrado, USP-ESALQ, 2011.
- BRAS, J., VIET, D., BRUZZESE, C., DUFRESNE, A. Correlation between stiffness of sheets prepared from cellulose whiskers and nanoparticles dimensions. *Carbohydrate Polymers*, 84: 211–215, 2011.
- BULL, A.T., WARD, A.C., GOODFELLOW, M. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 64: 573-606, 2000.
- CHEN, C., MEI, H., CHENG, C., LIN, J., CHUNG, Y. Enhancing the conversion of organic waste into biofertilizer with thermophilic bacteria *Environmental Engineering Science*. 29: 726-730, 2012.
- CRUZ, J.B. O processo de compostagem como instrumento de preservação ambiental na Fundação Parque Zoológico de São Paulo (FPZSP). Pôster apresentado no I Simpósio sobre Compostagem, Ciência e Tecnologia, na UNESP, Botucatu-SP, 2004.
- D'SOUZA, D.T., TIWARI, R., SAH, A.K., RAGHUKUMARA, C. Enhanced production of laccase by a marine fungus during treatment of colored effluents and synthetic dyes. *Enzyme and Microbial Technology*, 38: 504–511, 2006.
- DAUTY, M.E. Fruit and vegetables processing, FAO agriculture services bulletins 119. FAO, Rome, 1995.
- DEES, P.M., GHIORSE, W.C. Microbial diversity in hot synthetic compost as revealed by PCR-amplified rRNA sequences from cultivated isolated and extracted DNA. *Microbiology Ecology*, 35: 207-216, 2001.
- DEKA, D., BHARGAVI, P., SHARMA, A., GOYAL, D., JAWED, M., GOYA, A. Enhancement of Cellulase Activity from a New Strain of *Bacillus subtilis* by Medium Optimization and Analysis with Various Cellulosic Substrates. *Enzyme Research*, Article ID 151656, 8 pages, 2011.
- DEUTSCHER, J., GALINIER, A., MARTIN-VERSTRAETE, I. IN: SONENSHEIN, A.L., HOCH, J.A., LOSICK, R. *Bacillus subtilis* and its closest relatives: from genes to cells. *American Society for Microbiology*, 129-150, 2002.
- DING, J.; CONG, J.; ZHOU, J.; GAO, S. Polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation and extracellular enzyme secretion in agitated and stationary cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Environmental Science e Technology*, 20: 88–93, 2008.
- EWING, B., HILLIER, L., WENDL, M., GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. *Genome Research*, 8:175–185, 1998.

- FAVERI, D.D., ALIAKBARIAN, B., AVOGADRO, M., PEREGO, P., CONVERTI, A. Improvement of olive oil phenolics content by means of enzyme formulations: effect of different enzyme activities and levels. *Biochemical Engineering Journal*, 41:149–156, 2008.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39:783-791, 1995.
- FUKUMORI, F., KUDO, T., HORIKOSHI, K. Purification and properties of a cellulase from alkalophilic *Bacillus* sp. *Journal of General Microbiology*, 131: 129–135, 1985.
- GALANTE, Y.M., DE CONTI, A., MONTEVERDI, R. Application of *Trichoderma* enzymes in food and feed industries. In: Harman GF, Kubicek CP (eds) *Trichoderma e Gliocladium - Enzymes, biological control and commercial applications*, vol 2. Taylor e Francis, London, 327–342, 1998.
- GORDON, D. "Viewing and Editing Assembled Sequences Using Consed", in *Current Protocols in Bioinformatics*, A. D. Baxevanis and D. B. Davison, eds, New York: John Wiley , Co., 11.2.1-11.2.43, 2004.
- GORDON, D., ABAJIAN, C., GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Research*, 8:195-202, 1998.
- GRAHAM, H., BALNAVE, D. Dietary enzymes for increasing energy availability. In: Wallace RJ, Chesson A (eds) *Biotechnology in animal feeds and animal feedings*. VHC, Weinheim, 296–309, 1995.
- GRASSIN, C., FAUQUEMBERGUE, P. Wine. In: Godfrey, T., West, S. (eds) *Industrial enzymology*, 2nd edn. Macmillan Press, London, pp 374–383, 1996.
- GROHMAN, K., BALDWIN, E.A. Hydrolysis of orange peel with pectinase and cellulase enzymes. *Biotechnology Letters*, 14:1169–1174, 1992.
- GUPTA, R., MEHTA, G., DESWAL, D., SHARMA, S., JAIN, K.K., SINGH, A., KUHAD, R.C. Cellulases and Their Biotechnological. Applications *Biotechnology for Environmental Management and Resource Recovery*, 2013. DOI 10.1007/978-81-322-0876-1_6, Springer, India.
- GUPTA, R., SHARMA, K.K., KUHAD, R.C. Separate hydrolysis and fermentation (SHF) of *Prosopis juliflora*, a woody substrate, for the production of cellulosic ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*-NCIM 3498. *Bioresource Technology*, 100:1214–1220, 2009.
- HABIBI, Y., LUCIA, L.A., ROJAS, O.J. Cellulose nanocrystals: Chemistry, selfassembly, and applications. *Chemical Reviews*, 110: 3479–3500, 2010.

- HARUTA, S., NAKAYAMA, T., NAKAMURA, K., HEMMI, H., ISHII, M., IGARASHI, Y., NISHINO, T., Microbial diversity in biodegradation and reutilization processes of garbage. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99: 1–11, 2005.
- HASSEN, A., BELGUITH, K., JEDIDI, N., CHERIF, A., CHERIF, M., BOUDABOUS, A. Microbial characterization during composting of municipal solid waste. *Biosource Technology*, 64: 7-15, 22: 522-528, 2001.
- HOLMALAHTI, J., VON WRIGHT, A., RAATIKAINEN, A.O. Variations in the spectra of biological activities of actinomycetes isolated from different soils. *Letters in Applied Microbiology*, 18:144-146, 1994.
- HUI, Y.H. Handbook of fruits and fruit processing. Blackwell, Iowa, 2006.
- HULTMAN, J. Microbial diversity in the municipal composting process and development of detection methods. Academic dissertation in Environmental Ecology, 2009.
- HUMPF, H.U., SCHRIER, P. Bound aroma compounds from the fruit and the leaves of blackberry (*Rubus laciniata*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39:1830–1832, 1991.
- IBRAHIMA, N.A., EL-BADRY, K., EID, B.M., HASSAN, T.M. A new approach for bio finishing of cellulose-containing fabrics using acid cellulases. *Carbohydrate Polymers*, 83:116–121, 2010.
- INSAM, H. E BERTOLDI, M. Waste management series. *Compost Science and Technology, Chapter 3 Microbiology of the composting process*, 08: 25-48, 2007.
- IRFAN, M., SAFDAR, A., SYED, Q., NADEEM, M. Isolation and screening of cellulolytic bacteria from soil and optimization of cellulase production and activity. *Turkish Journal of Biochemistry*, 37:287-293, 2012.
- JUHASZ, T., SZENGYEL, Z., RECZEY, K., SIIKA-AHO, M., VIKARI, L. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. *Process Biochemistry*, 40:3519–3525, 2005.
- Junior, A.F. Enzimas: aspectos gerais. Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.
- KAWAI, S., OKOSH, H., OZAKI, K.S., SHIKATA, K.A., ITO, S. Neutrophilic *Bacillus* strain, KSM-522 that produces an alkaline carboxymethyl cellulase. *Agricultural and Biological Chemistry*, 52:1425–1431, 1998.
- KIKANI, B.A., SHUKLA, R.J., SINGH, S.P. Biocatalytic potential of thermophilic bacteria and actinomycetes. *Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, 1000-1007, 2010.
- KIMURA, M. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16:111-120, 1980.

- KIRK, O., BORCHERT, T.V., FUGLSANG, C.C. Industrial enzyme applications. *Current Opinion Biotechnology*, 13:345–351, 2002.
- KRAMMER, G., WINTERHALTER, P., SCHWAB, M., SCHRIER, P. Glycosidically bound aroma compounds in the fruits of Prunus species: apricot (*P. armeniaca*, L.), Peach (*P. persica*, L.), Yellow plum (*P. domestica*, L. ssp. *Syriaca*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39:778–781, 1991.
- KUHAD, R.C., GUPTA, R., KHASA, Y.P. Bioethanol production from lignocellulosic biomass: an overview. In: Lal B (ed) *Wealth from waste*. Teri Press, New Delhi, 53–106, 2010a.
- KUHAD, R.C., GUPTA, R., KHASA, Y.P., SINGH, A. Bioethanol production from *Lantana camara* (red sage): pretreatment, saccharification and fermentation. *Bioresource Technology*, 101:8348–8354, 2010b.
- KUHAD, R.C., MEHTA, G., GUPTA, R., SHARMA, K.K. Fed batch enzymatic saccharification of newspaper cellulose improves the sugar content in the hydrolysates and eventually the ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomass and Bioenergy*, 34:1189–1194, 2010c.
- KUHAD, R.C., GUPTA, R., SINGH, A. (2011) Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme res*, 2011 (Article ID 280696):10p. doi: 10.4061/2011/280696.
- KUNG, L. JR., KRECK, E.M., TUNG, R.S., HESSION, A.O., SHEPERD, A.C., COHEN, M.A., SWAIN, H.E., LEEDLE, J.A.Z. Effects of a live yeast culture and enzymes on in vitro ruminal fermentation and milk production of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 80:2045–2051, 1997.
- LACEY, J. Actinomycetes in composts. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 4, 113-121, 1997.
- LANE, D.J. (1991) 16S/23S rRNA sequencing. In: Goodfellow M, Stackebrandt E (eds) *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Chichester: John Wiley e Sons, p 115-147, 1991.
- LAVOINE, N., DESLOGES, I., DUFRESNE, A., BRAS, J. Microfibrillated cellulose – Its barrier properties and applications in cellulosic materials: A review. *Carbohydrate Polymers*, 90: 735– 764, 2012.
- LEE, Y.J., KIM, B.K., LEE, B.H., JO, K.I., LEE, N.K., CHUNG, C.H., LEE, Y.C., LEE, J.W. Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyoliquefaciens* DL-3 utilizing rice hull. *Bioresource Technology*, 99: 378–386, 2008.
- LEWIS, G.E., HUNT, C.W., SANCHEZ, W.K., TREACHER, R., PRITCHARD, G.T., FENG, P. Effect of direct-fed fibrolytic enzymes on the digestive characteristics of a foragebased diet fed to beef steers. *Journal of Animal Science*, 74:3020–3028, 1996.

- LIANG, Y., YESUF, J., SCHMITT, S., BENDER, K., BOZZOLA, J. Study of cellulases from a newly isolated thermophilic and cellulolytic *Brevibacillus* sp. Strain JXL. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 36, 961-970, 2009.
- LIMA, A.L.G.D., NASCIMENTO, R.P.D., BOM, E.P.D.S., COELHO, R.R.R. *Streptomyces drozdowiczii* cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. *Enzyme Microbial Technology*, 37:272–277, 2005.
- LIU, Y., ZHANG, J., LIU, Q., ZHANG, C., MA, Q. Molecular cloning of novel cellulose genes cel9A and cel12A from *Bacillus licheniformis* GXN151 and synergism of their encoded polypeptides. *Current Microbiology*, 49: 234-238, 2004.
- LYND, L.R., WEIMER, P.J., VAN ZYL, W.H., PRETORIUS, I.S. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66: 506–577, 2002.
- MAKI, MIRANDA, LEUNG, K.T., QIN, W. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *International Journal of Biological Sciences*, 5: 500-516, 2009.
- MANDELS, M. E REESE E.T. Inhibition of cellulases. *Annual Review Phytopathology*, 3:85-102, 1965.
- MCCARTHY, A.J. E WILLIAMS, S.T. Actinomycetes as agents of biodegradation in the environment – a review. *Gene*, 115: 189-192, 1992.
- MIRANDA, M., KAM, T.L., WENSHENG, Q. The prospects of cellulase- producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *Internacional Journal of Biological Sciences*, 5:500-516, 2009.
- MONDINI, C., INSAM, H. Community level physiological profiling as a tool to evaluate compost maturity: a kinetic approach. *European Journal of Soil Biology*, 39: 141–148, 2003.
- OLIVEIRA, M.F. Identificação e caracterização de actinomicetos isolados de processo de compostagem. *Dissertação de mestrado*, UFRGS, 2003.
- PADILHA, G. Biologia molecular de *Streptomyces* e aplicações industriais. In: Melo, I.S. e Azevedo, J.L. *Ecologia Microbiana*. Jaguariúna: Embrapa CNPMA. 327-343, 1998.
- PAINBENI, E., VALLES, S., POLAINA, J., FLORS, A. Purification and characterization of a *Bacillus polymyxa* beta-glucosidase expressed *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 174: 3087-3091, 1992.
- PANDEY, S., SINGH, S., YADAV, A.N., NAIN, L., SAXENA, A.K. Phylogenetic diversity and characterization of novel and efficient cellulose producing bacterial isolates from various extreme environments. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 77: 1474-1480, 2013.

- PAZARLIOGLU, N.K., SARIISIK, M., TELEFONCU, A. Treating denim fabrics with immobilized commercial cellulases. *Process Biochemistry*, 40:767–771, 2005.
- PEREIRA, F.B., GUIMARÃES, P.M.R., TEIXEIRA, J.A.; DOMINGUES, L. Optimization of low-cost medium for very high gravity ethanol fermentations by *Saccharomyces cerevisiae* using statistical experimental designs. *Bioresource Technology*, 101: 7856-7863, 2010.
- PETERS, S., KOSCHINSKY, S., SCHWIEGER, F., TEBBE, C. C. Sucession of microbial communities during hotcomposting as detected by PCR-Single-Strand-Conformation Polymorphism-Based genetic profiles of small-subunit rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 930-936, 2000.
- PLACKETT, R.L., BURMAN, J.P. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 33: 305–325, 1946.
- RAMOS, G.F.C. Atividade celulolítica e proteolítica de bactérias isoladas do trato gastrointestinal e do processo de compostagem dos restos orgânicos de hipopótamo. Dissertação de mestrado, UNIFESP, 2013.
- RASTOGI, G., BHALLA, A., ADHIKARI, A., BISCHOFF, K.M., HUGHES, S.R., CHRISTOPHER, L.P., SANI, R.K. Characterization of thermostable cellulases produced by *Bacillus* and *Geobacillus* strains. *Bioresource Technology*, 101, 8798-8806, 2010.
- ROBSON, L.M. E CHAMBLISS, G.H. Characterization of the cellulolytic activity of a *Bacillus* isolate. *Applied and Environmental Microbiology*, 47: 1039–1046, 1984.
- RODRIGUES, M.I. E IEMMA, A.F. Planejamento de experimentos e otimização de processos. Cárita Editora, Campinas, Brasil, 358 p, 2009.
- RYCKEBOER, J., MERGAERT, J., VAES, K., KLAMMER, S., DE CLERCQ, D., COOSEMANS, J., INSAM, H., SWINGS, J. A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes. *Annals of Microbiology*, 53, 349-410, 2003.
- SAITOU, N., NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4:406-425, 1987.
- SARATALE, D.G. E OH, S.E. Production of thermo-tolerant and alkalotolerant cellulolytic enzymes by isolated *Nocardiopsis* sp. KNU. *Biodegradation*, 22:905-919, 2011.
- SARKAR, S., BANERJEE, R., CHANDA, C., DAS, P., GANGULY, D., PAL, S. Effectiveness of inoculation with isolated *Geobacillus* strains in the thermophilic stage of vegetable waste composting. *Bioresource Technology*, 101: 2892–2895, 2010.

- SHARMA, V. E SINGH, P.K. Strain Improvement of *Bacillus coagulans* and *Geobacillus stearothermophilus* for Enhanced Thermostable Cellulase Production and the Effect of Different Metal Ions on Cellulase Activity. *Engineering Journals Publications*, 4: 4704-4709, 2012.
- SHARMA, V., VIJ, H., SINGH, P.K., BHATT, S. (2013) Potential Cellulase Production, Optimization and Sachharification Study by Novel Thermophilic Microbes. *Journal of Sustainable Biotechnology*, 1:20-27, 2013.
- SHI, X., KIM, D.H., SHIN, H.S., JUNG, K.W. Effect of temperature on continuous fermentative hydrogen production from *Laminaria japonica* by anaerobic mixed cultures. *Bioresource Technology*, 144: 225-231, 2013.
- SILVA, C.S., AZEVEDO, R.S., BRAGA, C., SILVA, R., DIAS, E.S., SCHWAN, R.F. Microbial diversity in a bagasse-based compost prepared for the productions of *Agaricus brasiliensis*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 590-600, 2009.
- SILVA, N.L.C. Produção de bioetanol de segunda geração a partir de biomassa residual na indústria de celulose. Dissertação de mestrado, UFRJ, 2010.
- SINGHA, A., YADAVB, R.D., KAURA, A., MAHAJANA, R. An ecofriendly cost effective enzymatic methodology for deinking of school waste paper. *Bioresource Technology*, 120: 322–327, 2012.
- SIQUEIRA, G., BRAS, J., DUFRESNE, A. Cellulosic bionanocomposites: A review of preparation, properties and applications. *Polymer*, 2: 728–765, 2010a.
- SONG, L., MA, F., ZENG, Y., ZHANG, X., YU, H. The promoting effects of manganese on biological pretreatment with *Irpex lacteus* and enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresource Technology*, 135: 89-92, 2013.
- SOUZA, L. P., ASTOLFI FILHO, S., PEREIRA, J.O. Diversidade bacteriana endofítica de diferentes plantas tropicais. Resumos da 7ª Reunião Especial da SBPC. Manaus-AM, 2001.
- SREENATH, H.K., SUDARSHANAKRISHNA, K.R., SANTHANAM, K. Improvement of juice recovery from pineapple pulp/residue using cellulases and pectinases. *Journal Fermentation and Bioengineering*, 78:486–488, 1994.
- SUKUMARAN, R.K., SINGHANIA, R.R., PANDEY, A. Microbial cellulases production, applications and challenges. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 64:832–844, 2005.
- TAIWO, L.B.; OSO B.A. Influence of composting techniques on microbial succession, temperature and pH in a composting municipal solid waste. *African Journal of Biotechnology*, 4: 239-243, 2004.

- TAMARU Y., MIYAKE H., KURODA K, UEDA M. E DORI RH Comparative genomics of the mesophilic cellulosome producing *Clostridium cellulovorans* and its application to biofuel production via consolidated bioprocessing. *Environmental Technology*, 31: 889-903, 2010.
- TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, NEI M, AND KUMAR S MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28: 2731-2739, 2011.
- TANG, J.C., KANAMORI, T., INOUE, Y., YASUTA, T., YOSHIDA, S., KATAYAMA, A., Changes in the microbial community structure during thermophilic composting of manure as detected by the quinone profile method. *Process Biochemistry*, 39: 1999–2006, 2004.
- TEATHER, R. E WOOD, P.J. Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology*, 777-780, 1982.
- THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F., HIGGINS, D.J. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24:4876-4882, 1997.
- TURNER, S., PRYER, K.M., MIAO, V.P.W., AND PALMER, J.D. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46: 327–338, 1999.
- VAN SOOLINGEN, D., HAAS, P.E.W., HERMANS, P.W.M., GROENEN, P.M.A., VAN EMBDEN, J.D.A. Comparison of Various Repetitive DNA Elements as Genetic Markers for Strain Differentiation and Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1987-1995, 1993.
- WARD, O.P., SINGH, A. (2002) Bioethanol technology: developments and perspectives. *Advances in Applied Microbiology*, 51:53–80, 2002.
- WEI, Y.S., FAN, Y.B., WANG, M.J., WANG, J.S. Composting and compost application in China. *Resources, Conservation and Recycling*, 30: 277-300, 2000.
- WENZEL, M., SCHOÈ NIG, I., BERCHTOLD, M., KAÈMPFER, P., KOÈ NIG, H. Aerobic and facultatively anaerobic cellulolytic bacteria from the gut of the termite *Zootermopsis angusticollis*. *Journal of Applied Microbiology*, 92: 32-40, 2002.
- XIAO, Z., STORMS, R., TSANG, A. Microplate-based filter paper assay to measure total cellulase activity. *Biotechnology and Bioengineering*, 88: 832-837, 2004.

ZAMBARE, V.P., BHALLA, A., MUTHUKUMARAPPAN, K., SANI, R.K., CHRISTOPHER, L.P.
Bioprocessing of agricultural residues to ethanol utilizing a cellulolytic extremophile. *Extremophiles*, 15:
611-618, 2011.

8 Anexos

Anexo 1. Variáveis estudadas no planejamento P&B: matriz A.

Variáveis	-1	0	+1
1. pH	4,8	6,1	7,4
2. KH_2PO_4 (g/L)	0	2	4
3. $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$	0	1,4	2,8
4. $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0	0,3	0,6
5. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0	0,3	0,6
6. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0	0,005	0,010
7. $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0	0,0016	0,0032
8. $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0	0,0014	0,0028
9. CoCl_2	0	0,002	0,004
10. Tween 80	0	1	2
11. Peptona	0,5	1	1,5
12. Extrato de levedura	0,5	1	1,5

Anexo 2. Efeito de cada variável gerado a partir dos resultados da matriz A, do P&B. As variáveis significativas ($p < 0,1$) estão destacadas com asterisco.

Variáveis	Amostra 34		Amostra 37		Amostra 143		Amostra 230		Amostra 347	
	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor	Efeito	p-valor
Média	0,311905	0,112448	0,548451	0,009299	1,56842	0,000024	1,005843	0,003714	0,350632	0,042937
pH*	0,385303	0,332704	0,694788	0,070997*	0,00124	0,996762	0,155364	0,755773	0,462363	0,172447
KH ₂ PO ₄ (g/L)	-0,333100	0,397557	-0,309485	0,366820	-0,21751	0,487022	-0,468578	0,364001	0,186437	0,555325
(NH ₄)SO ₄	-0,514565	0,209101	-0,485978	0,176316	-0,50338	0,137465	-0,043502	0,930324	-0,101919	0,744470
CaCl ₂ .H ₂ O	0,479764	0,237574	0,371631	0,285690	-0,20757	0,506355	0,607784	0,249852	-0,285870	0,375303
MgSO ₄ .7H ₂ O*	-0,009943	0,979193	0,013672	0,967012	-1,27647*	0,004849*	-0,016158	0,974084	0,029830	0,923670
FeSO ₄ .7H ₂ O *	-0,119320	0,755332	-0,336829	0,329065	-0,76688	0,040101*	-0,031073	0,950192	0,161579	0,607876
MnSO ₄ .H ₂ O	0,265983	0,494482	0,349258	0,312984	0,00870	0,977335	-0,137963	0,782202	-0,062146	0,842001
ZnSO ₄ .7H ₂ O	-0,238639	0,538289	-0,021129	0,949045	-0,10316	0,737478	-0,543152	0,298380	-0,362930	0,269802
CoCl ₂ *	0,599083	0,152551	0,667444	0,079971*	-0,93094	0,019348*	1,065175	0,067044*	0,462363	0,172447
Tween 80	0,323157	0,410952	0,202595	0,546538	0,45366	0,173487	0,018644	0,970099	0,439991	0,191004
Peptona*	0,203838	0,597482	0,786763	0,047753*	-0,05593	0,855288	0,381574	0,454369	-0,377845	0,252604
Extrato de levedura	0,109376	0,774997	-0,520780	0,151674	0,22745	0,468200	0,530723	0,308581	0,484736	0,155601

Anexo 3. Valores em FPU/mL da atividade enzimática de cinco micro-organismos selecionados, após a aplicação do planejamento Plackett-Burman.

	Amostras				
pH de leitura	7,4	7,4	6,1	6,1	6,1
Ensaio	34	37	143	230	347
1	0	1,7600	0,8949	0,5668	0
2	0	0,0597	2,3566	1,2429	2,5455
3	0,3878	1,5014	2,5952	0,0398	0,3381
4	1,4020	0,0994	2,7841	1,0540	0
5	0	0	0	1,8097	0,5668
6	0	0	1,0142	0,6761	0,1392
7	1,0142	0,5369	1,0739	0,3082	0
8	1,9489	0	0,8253	0,4972	0,9645
9	2,5654	1,6009	0,7457	1,2429	0
10	0,6960	0	1,0739	0,3082	0,5867
11	1,5909	1,4915	1,1236	2,0384	0,2884
12	2,9532	2,7941	1,5114	3,6492	1,1534
13	0	0	1,2230	0,4673	0
14	0	0	1,2926	1,7500	0
15	0,6761	0	3,6392	0	0
16	0,1989	0,2287	3,2912	1,0440	0
17	0	0,0497	1,9489	1,9887	0
18	0	0	1,7997	0,0199	0
19	2,6051	0,2983	0,6065	0,4077	0,0795

Anexo 4. Variáveis estudadas no planejamento DCCR: matriz B.

Variáveis	-1,68	-1	0	+1	+1,68
1. MnSO ₄ .H ₂ O (g/L)	0,0032	0,0036	0,0041	0,0046	0,005
2. Tween 80	2	2,1	2,25	2,4	2,5
3. Extrato de levedura (g/L)	1,5	1,7	2	2,3	2,5

Anexo 5. Matriz codificada do planejamento experimental Plackett-Burman.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1
2	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1
3	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1
4	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1
5	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1
6	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1
7	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
8	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1
9	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1
10	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1
11	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1
12	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1
13	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1
14	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1

15	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1
16	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
17 (C)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18 (C)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
19 (C)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20 neg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Anexo 6. Matriz codificada do planejamento experimental DCCR.

Ensaio	X₁	X₂	X₃
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	-1,68	0	0
10	1,68	0	0
11	0	-1,68	0
12	0	1,68	0
13	0	0	-1,68
14	0	0	1,68
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0