

**DETERMINAÇÃO DE CONDIÇÕES IDEAIS PARA  
A PRODUÇÃO DE POLIGALACTURONASE POR**  
*Kluyveromyces marxianus*

**CLAUDIA EUGÊNIA CASTRO BRAVO**

1912

1912

45346

13101 MFW.

CLAUDIA EUGÊNIA CASTRO BRAVO

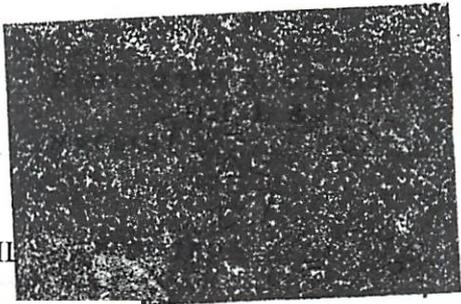
**DETERMINAÇÃO DE CONDIÇÕES IDEAIS PARA  
A PRODUÇÃO DE POLIGALACTURONASE POR  
*Kluyveromyces marxianus***

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Microbiologia, para a obtenção do título de "Mestre".

**Orientadora:**

Prof. Dr<sup>a</sup>. Eliana Pinheiro de Carvalho

LAVRAS  
MINAS GERAIS - BRASIL  
1998



Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da UFLA

Castro-Bravo, Claudia Eugênia

Determinação de condições ideais para a produção de poligalacturonase por  
*Kluyveromyces marxianus* / Claudia Eugênia Castro Bravo. -- Lavras : UFLA,  
1998.

57 p. : il.

Orientadora: Eliana Pinheiro de Carvalho.

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Poligalacturonase. 2. *Kluyveromyces marxianus*. I. Universidade Federal  
de Lavras. II. Título.

CDD-589.233  
-574.1925

# CLAUDIA EUGÊNIA CASTRO BRAVO

## DETERMINAÇÃO DE CONDIÇÕES IDEAIS PARA A PRODUÇÃO DE POLIGALACTURONASE POR *Kluyveromyces marxianus*

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Microbiologia, para a obtenção do título de "Mestre".

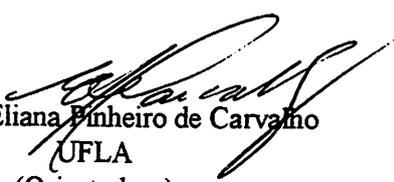
APROVADA em 12 de Novembro de 1998

Prof<sup>ª</sup> Dra. Rosane Freitas Schwan

UFLA

Prof. Dr. Augusto Ramalho de Moraes

UFLA

  
Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Eliana Pinheiro de Carvalho  
UFLA  
(Orientadora)

LAVRAS  
MINAS GERAIS-BRASIL

**A Roberto Pose Martins**

**OFEREÇO**

**À minha filha,**

**Roberta Castro Martins**

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Deidamia e Raúl, que, com amor e apoio, tornaram possível a minha formação.

Aos meus irmãos, Paula e Raúl pela presença e carinho constantes.

Ao meu marido, pelo amor, compreensão, paciência e apoio.

À D. Júlia, Sr. Osvaldo, Ivani, Osvaldinho, pela ajuda, apoio e carinho.

À Ana Paula Rodrigues, pela amizade e ajuda em momentos difíceis.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Eliana Pinheiro de Carvalho, não apenas pela orientação, mas principalmente pela amizade, pela paciência, e pelo incentivo.

À professora Dr<sup>a</sup> Rosane Freitas Schwan, pelo profissionalismo.

À Lucimeire Pilon, pela amizade e ajuda durante a fase de laboratório.

A todos os colegas do curso de mestrado; Larissa, Lidiane, Silvia Regina, Antônio (Belo), Giulliano (Giuli), e muitos outros aqui não citados, pelos momentos divertidos e agradáveis.

À Universidade Federal de Lavras, A FAPEMIG e CAPES pela oportunidade oferecida para a realização do curso.

Aos funcionários e professores de departamento de Ciência dos Alimentos, sem os quais a realização desta pesquisa não seria possível.

Aos funcionários da Biblioteca.

A todos que de alguma maneira, participaram e colaboraram na realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	vii
1- INTRODUÇÃO .....	1
2- REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1- Substâncias pécticas .....	3
2.2- Enzimas pectinolíticas .....	4
2.2.1- Enzimas pectinolíticas x Indústria .....	6
2.2.2- Enzimas x Microrganismos .....	7
3- MATERIAL E MÉTODOS .....	13
3.1- Microrganismo.....	13
3.2-Substratos utilizados. nos meios de fermentação.....	13
3.3- Equipamentos utilizados.....	13
3.4- Planejamento Fatorial Fracionário $2^{(7-4)}$ .....	14
3.5- Planejamento Fatorial Fracionário $2^{(5-2)}$ .....	16
3.6- Delineamento central composto rotacional de análise de superfície de resposta de um fatorial $5^3$ .....	17
3.7- Delineamento central composto rotacional de análise de superfície de resposta de um fatorial $5^2$ .....	19
3.8- Determinação de proteína total.....	21
3.9- Determinação de Biomassa.....	21
3.10- Análise estatística.....	22
4- RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	23
4.1- Planejamento Fatorial Fracionário $2^{(7-4)}$ .....	23
4.2- Planejamento Fatorial Fracionário $2^{(5-2)}$ .....	25
4.3- Planejamento de análise de superfície de resposta $5^3$ .....	28
4.4- Planejamento de análise de superfície de resposta $5^2$ .....	33
4.4.1- Produção de massa celular .....	33
4.4.2- Produção de proteínas solúveis .....	37
4.4.3- Atividade enzimática da poligalacturonase .....	40
5- CONCLUSÃO .....	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	46
ANEXOS .....	52

## RESUMO

**CASTRO-BRAVO, Claudia Eugênia. Determinação de condições ideais para produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*. Lavras: UFLA, 1998. 57p. (Dissertação - Mestrado em Ciência dos Alimentos)<sup>1</sup>**

Enzimas pectinolíticas podem ser sintetizadas por bactérias, fungos e leveduras. Elas apresentam importância industrial, principalmente no processamento de suco de frutas e vinhos, tratamento de fibras têxteis, na fermentação do cacau e do café. A otimização das condições de cultivo, aliada a escolha de linhagens apropriadas pode levar a uma melhor produção enzimática. Este trabalho foi desenvolvido com a finalidade de selecionar e definir melhores concentrações de parâmetros a serem utilizados nos meios fermentativos, utilizando-se um planejamento fatorial fracionário saturado  $2^{(7-4)}$  e outro de  $2^{(5-2)}$ . A atividade da enzima foi dada em mg de ácido galacturônico liberados/ml. Os parâmetros selecionados para o meio fermentativo foram: caldo de cana-de-açúcar como fonte de carbono; sulfato de amônio como fonte de nitrogênio e a pectina cítrica como estimulador. O pH e agitação ficaram definidos em valores constantes de 5,0 e 150 rpm respectivamente. Para definir as melhores concentrações dos parâmetros selecionados foi utilizado um delineamento experimental central composto rotacional de superfície de resposta de um fatorial 53 e 52. De acordo com modelos de superfícies de respostas utilizados pode-se estimar que para se obter uma máxima atividade da enzima poligalacturonase o caldo de cana-de-açúcar deve ser utilizado em concentrações entre 9,17 a 14,83° Brix, suplementado com sulfato de amônio e pectina em concentrações entre 0,40 à 0,58 g/100 ml e 0,50 à 1,05g/100 ml respectivamente.

---

<sup>1</sup> Comitê Orientador: Eliana Pinheiro de Carvalho - UFLA (orientadora), Rosane Freitas Schwan - UFLA e Raúl Jorge Hernan Castro Gómez - UEL.

## ABSTRACT

**CASTRO-BRAVO, Claudia Eugênia** Determination of conditions suitable for polygalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*. Lavras: UFLA, 1998. 57p. (Master's dissertation in Food Science)<sup>2</sup>

Pectinolytic enzymes can be synthesized by bacteria, fungi and yeasts. They present industrial importance, mainly in the processing of fruit juices and wines, textil fiber treatments, in the fermentation of cocoa and coffee. The optimization of growing conditions, associated with the choice of suitable lines can lead to an improved enzyme production.. This work was developed with a view to screening and defining better parameter concentrations to be utilized in fermentation media by utilizing a saturated fraction factorial planning  $2^{(7-4)}$  and another of  $2^{(5-2)}$ . The enzyme activity was given in mg of released galacturonic acid/ml. The parameters selected for the fermentation medium were: sugar cane broth as a carbon source, ammonium sulphate as a nitrogen source and citric pectin as a stimulator. Both pH and shaking were established in constant values of 5,0 and 150 rpm, respectively. In order to define the best concentrations of the selected parameters, a switch compost central experimental design of response surface of factorial  $5^3$  and  $5^2$  was utilized. According to response surface models employed, it is possible to conclude for maximal activity of polygalacturonase enzyme to be obtained sugar cane broth should be utilized at concentrations between 9,17 to 14,83 °Brix, supplemented with ammonium sulphate and pectin at concentrations between 0,40 to 0,58 g/100 ml and 0,50 to 1,05 g/100ml, respectively.

---

<sup>2</sup> Guidance Committee: Eliana Pinheiro de Carvalho - UFLA (Adviser), Rosane Freitas Schwan - UFLA and Raúl Jorge Hernan Castro Gómez - (UEL).

# 1 INTRODUÇÃO

As enzimas, de um modo geral, são amplamente utilizadas nos mais diversos processos industriais, devido a sua especificidade e potencial catalítico. Além disso atuam a baixa temperatura e pressão e geralmente são reutilizadas evitando a poluição ambiental por dispensarem o uso de compostos químicos tóxicos. Entretanto, uma enzima torna-se de valor comercial somente se houver demanda ou possuir propriedades que atendam os requerimentos técnicos e econômicos do processo em escala industrial.

Preparações comerciais de pectinases são normalmente de origem fúngica e, especialmente, de *Aspergillus* e *Penicillium*, que exibem características de alta atividade de endopoligalacturonase e de pectina liase. As pectinas produzidas por *Aspergillus* são de grande importância por sua aceitabilidade na indústria de processamento de alimentos e a pectina liase é a única enzima capaz de hidrolizar, sem ação prévia de outras enzimas, pectinas altamente esterificadas, tal como a pectina de frutas.

Apesar das enzimas pecticas apresentarem relevante papel na destruição e apodrecimento de frutas e vegetais e por serem correlacionadas com patogenicidade de certos microrganismos desenvolvendo doenças em plantas, elas apresentam consideráveis aplicações na indústria têxtil e de alimentos.

Na indústria de alimentos estas enzimas atuam na extração, clarificação e despectinização de sucos de frutas e extração de óleo vegetal, bem como na produção de alimentos para bebês e em uso simultâneo com celulasas e hemicelulasas no tratamento de biomassa celulósica.

Na indústria têxtil pectinases têm sido empregadas na maceração do linho e no tratamento de fibras têxteis brutas, como a juta e o rami; na indústria de

fermentados também, como por exemplo, na fermentação do café, do cacau e do fumo.

A escolha do meio de cultura é tão essencial para o sucesso do processo fermentativo quanto a escolha do microrganismo. Nem sempre o meio que permite o melhor desenvolvimento do microrganismo favorece a formação destas enzimas. A produção otimizada e os parâmetros que afetam a síntese enzimática devem ser investigados sempre, pois as condições ótimas variam entre os diferentes microrganismos, assim como para diferentes enzimas.

Considerando o exposto acima, o presente trabalho teve como objetivo, selecionar e definir melhores concentrações de parâmetros a serem utilizados nos meios fermentativos para a produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Substâncias Pécicas

Substâncias pécicas são heteropolissacarídeos que ocorrem em todos os tecidos vegetais superiores. São encontradas em quantidades variáveis, na lamela média e parede primária das células, não excedendo 1% do peso fresco (Fogart e Kelly, 1983). São formadas por resíduos de ácido D-galacturônico com ligação glicosídica  $\alpha$ -(1,4), intercalados por resíduos de L-ramnose com ligação  $\alpha$ -(1,2) (Chapman et al., 1987; Saulnier, Brillovet e Joseleau, 1988). Alguns açúcares neutros, tipicamente D-glucose e L-arabinose e algumas vezes D-xilose e L-fucose, formam as cadeias laterais da molécula (Thibault e Rinaudo, 1985). As substâncias pécicas são classificadas em protopectina, ácido pécico, ácido pectínico e pectina. Esta classificação é realizada de acordo com a proporção de grupos carboxílicos das cadeias poligalacturônicas esterificadas por grupamentos metil-éster, com a presença de cadeias laterais glicosídicas e com a solubilidade (Sakai et al., 1993).

A protopectina é uma substância insolúvel em água, presente na parede celular das plantas, formada a partir da associação das cadeias laterais de moléculas de pectina com proteínas, hemicelulose e celulose. Quando submetida à hidrólise restrita, a protopectina é convertida em pectina (Sakai et al., 1993; Yoshitake et al., 1994).

Os ácidos pectínicos e pécicos são constituídos principalmente por unidades de ácido galacturônico; os primeiros apresentam uma porção considerável dos radicais carboxílicos esterificados por grupamentos metil, ao passo que as carboxilas dos últimos são essencialmente livres de metila. Os sais

derivados da neutralização desses ácidos por bases mono ou bivalentes são denominados pectinato e pectato (Sakai et al., 1993).

O termo pectina é utilizado para designar os ácidos pectínicos com graus variáveis de esterificação por grupos metil e que apresentam ligações com cadeias laterais oligo ou polissacarídicas (Barret e Northcote, 1965; Rexová-Benková e Markovic, 1976).

## 2.2 Enzimas Pectinolíticas

A classificação das enzimas pectinolíticas está baseada na sua ação sobre a estrutura poligalacturônica da molécula do substrato. De acordo com o modo de ação dessas enzimas, dividiram-nas em enzimas desesterificantes e despolimerizantes.

A enzima que catalisa a desesterificação das substâncias pecticas é denominada pectinesterase (PE), pectina metil esterase, pectina metoxilase ou pectina desmetoxilase. Esta enzima converte a pectina em ácido pectico e libera metanol e os sítios de ataque na molécula de pectina são, provavelmente, os grupos ésteres metílicos adjacentes aos grupos carboxílicos livres (Rombouts e Pilnik, 1980; Whitaker, 1984).

As despolimerases são classificadas conforme 1- especificidade da enzima pelo substrato (pectina ou ácido pectico); 2- a posição de clivagem na cadeia principal das substâncias pecticas, atuação ao acaso (endo-enzimas) ou a partir da extremidade redutora ou não redutora do substrato (exo-enzimas); 3- o mecanismo de reação de despolimerização (clivagem por  $\beta$ -eliminação ou hidrólise do substrato).

As enzimas que clivam as ligações glicosídicas  $\alpha$ -(1,4) do substrato específico entre resíduos de ácido galacturônico adjacentes, por meio do

mecanismo de ( $\beta$ -eliminação, resultando num produto com uma dupla ligação entre átomos de carbono 4 e 5 dos resíduos de ácido galacturônico, são denominadas transeliminases ou liases (Torzilli, 1978; Rombouts e Pilnik, 1980). As liases são classificadas em pectina liase (PL) e pectato liase (PAL), de acordo com o substrato sobre o qual atuam.

As despolimerases que atuam por hidrólise e tem como substrato o pectato são chamadas poligalacturonases, e as que degradam preferencialmente substratos com alto grau de esterificação são denominadas polimetilgalacturonases. As poligalacturonases são hidrolases que atuam mais em pectato que em pectina e resultam em mono e dissacarídeos (Pardo, Lapena, Gacto., 1991). Quanto aos mecanismos de ação sobre o substrato essas enzimas são classificadas em dois grupos: endopoligalacturonases que promovem a hidrólise ao acaso da cadeia de pectato, e exopoligalacturonase, que hidrolisam a cadeia de pectato a partir da extremidade não redutora. Um critério para se distinguir entre endo e exoenzima pode ser a percentagem das ligações glicosídicas clivadas necessárias para atingir a diminuição de 50% da viscosidade específica do substrato. Quando esse número é superior a 10%, significa que é uma exoenzima; no caso de endoenzimas esses valores são inferiores (Rombouts e Pilnik, 1972). A hidrólise do pectato ou de porções não esterificadas da cadeia de poligalacturonatos pela endopoligalacturonase produz uma série de oligogalacturonatos, podendo acumular mono, di e algumas vezes trigalacturonatos. A atividade da enzima diminui com o aumento do grau de esterificação do substrato. As endopoligalacturonases (endo-PG) atuam sobre polissacarídeos de alto peso molecular (Rexová-Benková e Markovic, 1976).

Atualmente são reconhecidas dois tipos de exopoligalacturonases, uma produzindo resíduos de galacturonato por ataque terminal sobre o pectato e ácido

poligalacturônico (Rombouts e Pilnik, 1980) e a outra, menos freqüente, produzindo ácido digalacturônico (Baron e Thibault, 1985).

### 2.2.1 Enzimas pectinolíticas x Indústria

O estudo das pectinases tem sido considerado de grande importância, em razão da aplicação nas indústrias que processam matéria prima vegetal, para remoção de substâncias pécticas, as quais inviabilizam o produto desejado (Ghildyal et al, 1981; Whitaker, 1984).

Na indústria de alimentos e fermentados, estas enzimas são empregadas na clarificação de sucos de frutas e vinhos (Manachini, Parini e Fortina, 1988; Mclellan, Kime e Lind, 1985; Rombouts e Pilnik, 1986).

Industrialmente os preparados comerciais de enzimas pectinolíticas são correntemente usados na extração e clarificação de sucos de frutas e vegetais, existindo duas possibilidades na utilização das enzimas. Primeiramente há a possibilidade do tratamento da polpa da fruta antes da extração do suco, efetuando-se dessa forma um tratamento de maceração, utilizando enzimas pécticas em associação com celulasas e hemicelulasas, objetivando parcial ou total liquefação da polpa da fruta para produção de massa de fruta e néctar e/ou aumentar a produção de suco e melhorar a extração de outros componentes da fruta como cor e "flavor". A segunda opção seria a utilização da enzima para tratamento do suco, visando redução da viscosidade antes da concentração do suco, estabilização de sucos clarificados e prevenir formação de turbidez e sedimentação de produtos finais (Baumann, 1981).

Na indústria de sucos de frutas, as enzimas pécticas são usadas para promover a degradação da pectina, pois esta se apresenta na forma de suspensão coloidal, mantendo consigo outras substâncias também suspensas (Ishii e

Yokotsuka, 1971). O processo de degradação da pectina presente no suco com as enzimas disponíveis no mercado resulta na descaracterização do sabor da fruta, pois estes produtos são compostos pela mistura das enzimas do complexo pectinolítico, geralmente PG e PE, que promovem além da quebra da pectina, a sua desesterificação, ocorrendo volatilização dos ésteres responsáveis pelo sabor (Alana et al, 1990). Além disso o uso da mistura que contém PE promove decréscimo da estabilidade do suco de fruta pela precipitação dos derivados da pectina desesterificado com íons de cálcio presentes no suco e liberação de metanol (Alana et al, 1989). Se o processo de clarificação for feito apenas com PL, a formação de metanol não é detectada no suco (Ishii e Yokotsuka, 1972).

As enzimas pectinolíticas agem de formas diferentes nos sucos de frutas e vegetais: 1) sucos límpidos e brilhantes (maçã, pera e uva) em que as enzimas aumentam a produção de suco durante a prensagem e a filtração do suco, promove a remoção do material em suspensão; 2) sucos com turbidez (laranja, ameixa, tomate e néctar), a poligalacturonase degrada rapidamente o ácido péctico formado, evitando dessa forma precipitação e originando uma opacidade estável; 3) produtos microbianos, onde a intenção é preservar a integridade da célula da planta, através de hidrólise seletiva dos polissacarídeos da lamela média através de enzimas conhecidas como macerases (Whitaker, 1984).

### **2.2.2 Enzimas x Microrganismos**

As enzimas pécticas são produzidas principalmente por plantas superiores e uma grande variedade de fungos filamentosos, leveduras e bactérias. A composição dos complexos enzimáticos pectinolíticos varia entre as espécies de microrganismos. Portanto, a seleção de isolados capazes de sintetizar enzimas

adequadas é um processo fundamental para uso industrial (Ueda, Fujio e Lim, 1982; El-Refai, Metwalli, El-Sambaiy, 1984).

Nos últimos anos, bactérias, leveduras e outros fungos despertaram grande interesse de estudo devido as inúmeras vantagens apresentadas, destacando-se dentre entre outras, as seguintes:

- não necessitam de amplos espaços para o seu crescimento e não dependem das condições atmosféricas (Guzman-Juarez, 1982); Ursini, 1974 e Falanghe, 1975).

- os fatores de crescimento como concentração de nutrientes, pH, temperatura, concentração de oxigênio e de células podem ser manipuladas facilmente (Snyder, 1970).

- conseguem degradar e crescer em uma gama de substratos, inclusive em resíduos industriais (Falanghe, 1975 e Guzman-Juarez, 1982), os quais podem ser aproveitados desde que se escolha o microrganismo apropriado ou adaptado para a finalidade desejada. Como decorrência deste fato, tem-se a redução ou o controle dos problemas de poluição causados por esses resíduos (Falanghe, 1975).

- possuem um crescimento rápido, quando as condições são favoráveis para o seu crescimento. A população de fungos chega a dobrar em intervalos de 4 a 12 horas, as leveduras de 1 a 3 horas e as bactérias de meia a 2 horas (Falanghe, 1975 e Snyder, 1970).

- podem ser manipulados geneticamente para obtenção de mutantes desejados (Batt e Sinskey, 1984 e Falanghe, 1975).

A produção de pectinases em microrganismos é influenciada pelas condições de cultivo, em particular, do meio de cultura, tipo e concentração da fonte de carbono, pH e temperatura do cultivo, além de outros fatores.

Leuchtenberger, Friese e Ruttloff (1989) analisaram a influência de diferentes fontes de carbono sobre o crescimento de *Aspergillus niger* e produção de PG e verificaram que a enzima foi produzida em meio contendo combinação de pectina e glicose. *A. niger* cresceu em vários açúcares, incluindo lactose e sacarose, com produção de PG e PE.

Os microrganismos crescem numa faixa muito ampla de pH, poucas espécies crescem quando os valores de pH são inferiores a 2 ou superiores a 10 e a maioria cresce em pH próximo a neutralidade (Stanier e Ingraham, 1986).

Em *Diplodia natalensis*, a atividade de endo-PG foi substancialmente aumentada pelo ajuste do pH do esudado do fungo, de seu valor inicial 3,6 para 8,5 (Barmore, Snowden e Brown, 1984). Ueda, Fujio e Lim (1982) avaliaram a atividade de *Aspergillus niger* em meios de cultura com diferentes valores de pH e verificaram que a atividade das enzimas variou em função do pH dos meios. A atividade de PG foi maior em meio com pH 4,0 quando comparada a meios com pH 6,0. Esses autores sugeriram que uma das razões pela qual a produção e atividade das enzimas pécnicas varia com o pH do meio da cultura parece estar relacionada com a estabilidade do pH de cada enzima pécnica. A produção de poligalacturonase em *Fusarium oxysporum* e *Fusarium moniliforme* foi maior em pH de crescimento de 4,5 e 5,0 respectivamente (Mehta e Mehta, 1985). Fiedurek, Ilczuk e Lobarzewski (1989), utilizando *Aspergillus niger*, detectaram pectinases após 12 horas de cultivo, ocorrendo aumento progressivo nessa produção com o passar do tempo, sendo o valor máximo alcançado após 96 horas de cultivo. Nesse mesmo microrganismo, os valores ideais de pH e temperatura encontrados para a produção de pectinases foram 6,0 e 35°C, respectivamente.

Por outro lado, Baracat, Vanetti e Araújo (1991) trabalhando com *Aspergillus fumigatus*, determinaram que a atividade máxima de

poligalacturonase ocorre após 36 horas de cultivo, em pH 3,1 e a temperatura de 45°C.

Wick e Schoeder (1982), trabalhando com *Fusarium tricinctum*, analisaram a temperatura e o pH ótimos para atividade enzimática, encontrando valores entre 35 e 40°C e 4,0 respectivamente. Em experimentos realizados por Beausejour, Lesuy e Ramalho (1971), foram testados diferentes pH iniciais (pH 3,0 a 7,0) no crescimento do *Kluyveromyces fragilis* em meio contendo soro de queijo suplementado, observando que o maior crescimento desse microrganismo ocorreu em pH 4,0 e 5,0 para culturas de 24, 48, e 72 horas.

Estudos realizados com endopoligalacturonase de *Kluyveromyces fragilis* e *Aureobasidium pullulans* revelaram resultados semelhantes, com o pH variando de 4,0 a 5,0 e a temperatura de 50 a 60°C (Sakai, Okushima, Yoshitake, 1983; Sakai e Takaoka, 1984).

Como o pH, a temperatura também tem seu papel de destaque, uma vez que afeta a viabilidade e o crescimento microbiano, o número de microrganismos no final do processo, a composição química e enzimática das células, como também suas necessidades nutricionais (Olson e Nottingham, 1980).

Todo microrganismo possui uma temperatura ótima de crescimento, pois quando se eleva a mesma até esse ponto, ocorrerá nas células um aumento das reações químico-enzimáticas e conseqüentemente, o crescimento celular torna-se mais rápido (Brock, Smith e Madigan., 1979 e Olson e Nottingham, 1980). Porém se o aumento persistir e ultrapassar a temperatura máxima suportada pelos microrganismos ocorrerá a morte dos mesmos, que será mais evidente quanto maior for o tempo de exposição a essa temperatura (Olson e Nottingham, 1980). Por outro lado, a medida que a temperatura decresce afastando-se do ponto ótimo, o crescimento celular torna-se cada vez mais lento, até chegar o momento

onde cessará. Nesse ponto pode-se dizer que se está abaixo da temperatura mínima suportada pelos microrganismos (Olson e Nottigham, 1980 e Stanier e Ingraham, 1986).

Temperaturas de 32°C foram utilizadas por El Samragy e Zall (1988) quando cultivaram nove leveduras (incluindo *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 282440) em frascos agitados contendo soro de queijo permeado, objetivando estudar a influência do cloreto de sódio na produção de proteínas unicelulares.

Experimentos utilizando a temperatura de 30°C foram desenvolvidos por Delaney, Kennedy, Walley (1975) e Vananuvat e Kinsella (1975), ambos visando a produção de *Kluyveromyces fragilis* utilizando como substrato lactose suplementada.

Schwan e Rose (1994) também utilizaram uma temperatura 30°C para verificar os efeitos dos polissacarídeos e concentrações de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> na produção de poligalacturonase de *Kluyveromyces marxianus* (CCT 3172). A temperatura ótima de atividade das poligalacturonases dos fungos *Cryphonectria parasitica*, *Venturia inaequalis*, *Aureobasidium pullulans* e *Botrytis cinerea* está entre 40 e 50°C (Manachini, Parini e Fortina, 1988; Johnston e Williamson, 1992; Valsangiacomo e Gessler, 1992; Gao e Shain, 1994). A poligalacturonase do fungo *Penicillium expansum*, do sobrenadante da cultura, foi estável em temperaturas abaixo de 40°C quando pré incubada por 1 hora em temperaturas entre 20 e 80°C (Freitas, 1991).

Quanto à agitação, pode-se dizer que varia de um experimento para outro e muitos trabalhos empregam somente a agitação enquanto que outros além dela fazem uso da injeção de ar. Porém, o uso da primeira ou da segunda condição vai

depende do objetivo do trabalho e das suas condições como por exemplo volume do meio.

Sendo assim, El-Samragy, Chen e Zall (1988) empregaram agitações de 120 rpm durante 5 dias em meio contendo 100 ml de soro permeado, com a finalidade de produzir biomassa e analisá-la, onde diante dessas condições obtiveram 40, 25 e 35% de proteína na biomassa dos microrganismos *Saccharomyces fragilis* e *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ATCC 28244, respectivamente.

Já Beausejour, Lesuy e Ramalho (1981) escolheram trabalhar com 250 rpm, quando utilizaram erlenmeyer de 500 ml de capacidade contendo 150 ml de soro de queijo suplementado.

Sandhu e Waraich (1983) optaram por agitações de 220 rpm e 280C ao cultivarem 9 gêneros de leveduras e entre elas *Kluyveromyces fragilis*, em frascos contendo 25 ml de extrato de levedura e caldo de malte, com a finalidade de detectar o tempo ótimo de incubação o qual nessas condições resultou em 96 horas para esse dado microrganismo.

Um outro fator que deve ser observado no cultivo de *Kluyveromyces fragilis* é a concentração dos nutrientes, pois esta pode afetar a velocidade e o crescimento celular ( Stanier e Ingraham, 1986).

A concentração de células vai aumentar com a concentração de nutrientes porém, em determinado momento, mesmo que se adicione mais nutrientes ao meio, o número total de células vai permanecer constante (Brock et al., 1979).

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Microrganismo

*Kluyveromyces marxianus*, foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Raúl J.H. Castro Gómez da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

### 3.2 Substratos utilizados nos meios de fermentação

- Caldo de Cana-de-açúcar fornecido pela Cooperativa Agropecuária de Rolândia Ltda. - COROL, Rolândia, PR.
- Soro de leite em pó fornecido pela Cooperativa Central de leite - CONFEPAR, Londrina, PR.
- Reagentes (Merck): Glicose, sulfato de amônio, pectina cítrica, fosfato ácido de potássio e uréia.

### 3.3 Equipamentos utilizados

- Centrífuga refrigerada marca Hitachi-Modelo Himac CR21
- Espectrofotômetro marca Femto modelo 482
- Balança analítica Mettler-Toledo modelo AB204
- Estufa para determinação de umidade marca Fanem modelo Retilínea
- Incubadora refrigerada Marconi (shaker MA 830/A)

### 3.4 Planejamento fatorial fracionário saturado 2<sup>(7-4)</sup>

Os níveis dos substratos testados encontram-se descritos na Tabela 1. Estes níveis foram determinados aleatoriamente e através de ensaios prévios, para adequação das concentrações dos substratos e aplicação do delineamento experimental.

**TABELA 1: Parâmetros, unidade e respectivos níveis mínimo e máximo testados.**

Parâmetro	Unidade	Nível (-)	Nível (+)
Caldo de Cana	°Brix	2,0	8,0
Soro de Queijo	g/ 100 ml	2,0	8,0
Sulfato de Amônio	g/ 100 ml	2,0	8,0
Glicose	g/ 100 ml	2,0	8,0
Pectina	g/100 ml	0,2	2,0
Agitação	rpm	100	300
pH		3,5	5,5

Utilizou-se um planejamento fatorial fracionário saturado 2<sup>(7-4)</sup>, conforme Tabela 2 para os diferentes tratamentos (8) utilizados para seleção das fontes de carbono e nitrogênio, pH e agitação. Este delineamento é recomendado para triagem de variáveis, permitindo calcular os contrastes de 7 variáveis em apenas 8 tratamentos. O planejamento da construção e análise do fatorial fracionário foram realizados de acordo com metodologias que podem ser vistas em Box e Drapper, 1987.

**TABELA 2: Matriz do planejamento fatorial fracionário 2<sup>(7-4)</sup>**

Ensaio N°	Caldo de Cana	Soro de queijo	Sulfato de Amônio	Glicose	Pectina	Agitação	pH
1	-	-	-	+	+	+	+
2	+	-	-	-	-	+	+
3	-	+	-	-	+	-	-
4	+	+	-	+	-	-	-
5	-	-	+	+	-	-	+
6	+	-	+	-	+	-	-
7	-	+	+	-	-	+	-
8	+	+	+	+	+	+	+

(+) e (-) representam os níveis máximo e mínimo de cada parâmetro testado respectivamente.

Após avaliação a resposta foi dada em mg de Ácido Galacturônico produzidos pela ação da enzima poligalacturonase presente no caldo de fermentação após centrifugação. As análises foram feitas em triplicatas e as médias foram utilizadas para os cálculos. O método de 3,5 dinitrosalicílico (D.N.S.) foi o de Miller (1959), utilizando-se o sobrenadante do material centrifugado para determinação de poligalacturonase (PG) pela dosagem de açúcares redutores produzidos.

A seleção dos parâmetros testados foi realizada a partir das estimativas dos contrastes ou efeitos, produzidos pelos substratos testados.

Os contrastes para cada parâmetro, foram estimados de acordo com a seguinte fórmula:

$$lj = 1/4 (A_j \times Y_i)$$

sendo:

$l_j$  = contraste dos componentes,

$A_j$  = níveis dos componentes (+/-)

$Y_i$  = respostas

### 3.5 Planejamento fatorial fracionário saturado $2^{(5-2)}$

Após a seleção dos parâmetros (agitação 150 rpm e pH 5,0), foi desenvolvido um planejamento fatorial fracionário saturado  $2^{(5-2)}$  onde foram utilizados os parâmetros caldo de cana, sulfato de amônio, pectina cítrica, fosfato de potássio e uréia, para verificação das melhores fontes de nitrogênio e um possível nutriente, conforme tabela 3 e 4. Este delineamento é recomendado para triagem de variáveis, permitindo calcular os contrastes de 5 variáveis em apenas 8 ensaios (Box e Drapper, 1987)

Os níveis dos substratos testados encontram-se na Tabela 3, foram determinados aleatoriamente e através de ensaios prévios, para adequação das concentrações dos substratos e aplicação do delineamento experimental.

**TABELA 3: Parâmetros, unidade e respectivos níveis mínimo e máximo testados**

Parâmetro	Unidade	Nível(-)	Nível(+)
Caldo de Cana	° Brix	8,0	16,0
Sulfato de Amônio	g/ 100 ml	6,0	12,0
Pectina	g/ 100 ml	2,0	12,0
Fosfato Ácido de Potássio	g/ 100 ml	0,2	0,6
Uréia	g/ 100 ml	0,5	1,5

**TABELA 4: Matriz do planejamento fatorial fracionário 2<sup>(5-2)</sup>**

Ensaio N°	Caldo de Cana	Sulfato de Amônio	Pectina	Fosfato Potássio	Uréia
1	+	+	+	+	+
2	+	+	-	+	-
3	+	-	+	-	+
4	+	-	-	-	-
5	-	+	+	-	-
6	-	+	-	-	+
7	-	-	+	+	-
8	-	-	-	+	+

(+) e (-) representam os níveis máximo e mínimo de concentração de cada parâmetro testado respectivamente.

Este delineamento experimental objetivou estudar, além do sulfato de amônio, outra fonte de nitrogênio e um possível nutriente, mantendo-se como fonte de carbono o caldo de cana de açúcar, para verificar se poderiam eventualmente ter um melhor efeito na produção da enzima em estudo.

Os contrastes para cada parâmetro, foram estimados de acordo com a fórmula anteriormente citada.

### 3.6 Delineamento central composto rotacional de análise de superfície de resposta de um fatorial 5<sup>3</sup>

Para determinar as melhores concentrações dos parâmetros definidos nos experimentos anteriores, visando obter o máximo de atividade da poligalacturonase do *Kluyveromyces marxianus*, fez-se um delineamento experimental usando o delineamento central composto rotacional de análise de superfície de resposta de um fatorial 5<sup>3</sup>, ou seja, estudar três variáveis em cinco níveis de variação.

De acordo com o item 3.5, foram identificados três parâmetros ou variáveis independentes que afetam a atividade da poligalacturonase, a saber: caldo de cana, sulfato de amônio e pectina. Visando a otimização da concentração destes componentes do meio de cultura, foi definido um delineamento experimental central composto rotacional para a avaliação de um fatorial  $5^3$ , ou seja, três variáveis, com cinco níveis de variação, constante de 15 tratamentos iniciais e mais 03 no ponto central, totalizando 18 experimentos. Os níveis dos parâmetros da Tabela 5 foram definidos por ensaios prévios realizados para o ajuste preliminar dos componentes selecionados nos delineamentos fatoriais fracionários já descritos, tendo como resposta ou variável dependente do sistema a atividade da enzima poligalacturonase.

**TABELA 5: Níveis dos parâmetros utilizados delineamento central composto rotacional com 18 pontos**

Parâmetros	Unidade	Código	Níveis				
			-V2	-1	0	+1	V2
Caldo de cana	° Brix	X <sub>1</sub>	9,172	10,0	12,0	14,0	14,83
Sulf. de Amônio	g/100 ml	X <sub>2</sub>	0,586	1,0	2,0	3,0	3,41
Pectina	g/100 ml	X <sub>3</sub>	1,172	2,0	4,0	6,0	6,83

OBS: V2 = Raiz Quadrada de 2 = 1.414

Na Tabela 6 encontram-se as variáveis descodificadas e codificadas que foram utilizadas no delineamento central composto rotacional em função dos tratamentos usados.

**TABELA 6: Níveis descodificados e codificados das variáveis utilizadas no delineamento experimental central composto rotacional**

Exp. Nº	Valores Descodificados			Valores Codificados		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
01	10,0	1,0	2,0	-1	-1	-1
02	14,0	1,0	2,0	+1	-1	-1
03	10,0	3,0	2,0	-1	+1	-1
04	14,0	3,0	2,0	+1	+1	-1
05	10,0	1,0	6,0	-1	-1	+1
06	14,0	1,0	6,0	+1	-1	+1
07	10,0	3,0	6,0	-1	+1	+1
08	14,0	3,0	6,0	+1	+1	+1
09	9,172	2,0	4,0	-1,414	0	0
10	14,83	2,0	4,0	+1,414	0	0
11	12,0	0,586	4,0	0	-1,414	0
12	12,0	3,41	4,0	0	+1,414	0
13	12,0	2,0	1,17	0	0	-1,414
14	12,0	2,0	6,83	0	0	+1,414
15	12,0	2,0	4,0	0	0	0
16	12,0	2,0	4,0	0	0	0
17	12,0	2,0	4,0	0	0	0
18	12,0	2,0	4,0	0	0	0

### 3.7 Delineamento central composto rotacional de análise de superfície de resposta de um fatorial 5<sup>2</sup>

Para determinar as melhores concentrações dos nutrientes definidos no experimento anterior, visando obter o máximo de atividade da poligalacturonase de *Kluyveromyces marxianus*, conduziu-se um experimento no delineamento central composto rotacional para análise de superfície de resposta em experimentos fatoriais 5<sup>2</sup>, conforme os níveis dos parâmetros sulfato de amônio e pectina mostrados na Tabela 7. Este delineamento experimental permite estudar duas variáveis em cinco níveis de variação, originando 11 experimentos

experimentos sendo que 3 deles corresponderam a repetições no ponto central (Box e Drapper, 1987).

**TABELA 7: Níveis dos parâmetros usados no delineamento central composto rotacional com 11 pontos**

Variável Independente	Níveis				
	-1,414	-1	0	+1	+1,414
Sulfato de Amônio, g/100ml	0.01716	0.1	0.3	0.5	0.58284
Pectina, g/100 ml	0.09290	0.3	0.8	1.3	1.50711

Os níveis das variáveis foram codificadas em -1,414, -1, 0, +1 e +1,414, conforme a equação abaixo:

$$x_i = \frac{X_i - X}{q}$$

sendo:

$x_i$  = número codificado

$X_i$  = valor real dos níveis

$X$  = média dos níveis

$q$  = diferença entre os níveis sucessivos das variáveis.

As respostas ou variáveis dependentes foram: biomassa formada (mg/ml), proteínas solúveis (mg/ml) e atividade enzimática da poligalacturonase (mg de Ácido galacturônico liberado/ml/min). Os fatores, ou variáveis independentes, estão especificados na Tabela 8 que mostra também os valores codificados e descodificados correspondentes.

**TABELA 8: Níveis e valores descodificados e codificados das variáveis utilizadas no delineamento experimental central composto rotacional**

Experim. Nº	Valores Descodificados		Valores Codificados	
	Sulfato g/100 ml	Pectina g/100 ml	Sulfato g/100 ml	Pectina g/100 ml
01	0,1	0,3	-1	-1
02	0,1	1,3	-1	+1
03	0,5	0,3	+1	-1
04	0,5	1,3	+1	+1
05	0,01716	0,8	-1,41421	0
06	0,58284	0,8	+1,41421	0
07	0,3	0,09290	0	-1,41421
08	0,3	1,50711	0	+1,41421
09	0,3	0,8	0	0
10	0,3	0,8	0	0
11	0,3	0,8	0	0

### 3.8 Determinação de Proteína Total

A proteína total foi determinada pelo método de Lowry et al. (1951) utilizando albumina bovina como padrão.

### 3.9 Determinação de Biomassa

Após a centrifugação, os sobrenadantes foram armazenados em erlenmeyers previamente esterilizados para realização das análises de atividade enzimática e proteína total. As massas celulares obtidas foram ressuspensas com água destilada e colocadas nas placas de petri previamente preparadas (600C/24 horas) e levadas para estufa. A determinação foi feita pela diferença do peso inicial e o peso final das placas.



### 3.10 Análise Estatística

Os delineamentos experimentais foram definidos pelo programa Statistica for windows, Release 5.0.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o softwar SAS "Statistical Analysis System".

O modelo de regressão utilizado foi:

$$y=a+b_1X_1+b_2X_2+b_3X_3+b_4X_1X_2+b_5X_1X_3+b_6X_2X_3+b_7X_1X_1+b_8X_2X_2+b_9X_3X_3$$

sendo:

y = variável resposta;

a = intercepto

$b_I$  = coeficiente de regressão associado à característica I;

$X_I$  = variável independente ( $X_1$ = caldo de cana,  $X_2$  = Pectina e  $X_3$  = Sulfato de amônio).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Planejamento fatorial fracionario saturado 2<sup>(7-4)</sup>

A partir dos níveis dos parâmetros testados e do planejamento fatorial fracionário 2<sup>(7-4)</sup> estudados para verificar os efeitos das variáveis na produção da enzima foi definido o delinamento experimental pelo programa de computador "Statistica for Windows, Release 5.0", conforme descrito na Tabela 9.

**TABELA 9: Delineamento experimental fatorial fracionário 2<sup>(7-4)</sup>**

Ensaio N°	Caldo de Cana	Soro de queijo	Sulfato de Amônio	Glicose	Pectina	Agitação	pH
1	2	2	2	8	2.0	300	5.5
2	8	2	2	2	0.2	300	5.5
3	2	8	2	2	2.0	100	3.5
4	8	8	2	8	0.2	100	3.5
5	2	2	8	8	0.2	100	5.5
6	8	2	8	2	2.0	100	3.5
7	2	8	8	2	0.2	300	3.5
8	8	8	8	8	2.0	300	5.5

Após aplicação da fórmula indicada para determinação dos contrastes ou efeitos para cada variável ou parâmetro, foram encontrados os resultados mostrados na tabela 10.

**TABELA 10: Resultados do fatorial fracionário 2<sup>(7-4)</sup>**

Parâmetros	Resultados
Caldo deCana	+213,99
Soro de queijo	+105,37
Sulfato de Amônio	+209,86
Glicose	+16,63
Pectina	+121,51
Agitação	+145,9
pH	+52,83

Através da análise dos dados apresentados na tabela 10 pode-se verificar que a levedura *Kluyveromyces marxianus* obteve resultados positivos em relação aos nutrientes( caldo de cana-de-açúcar, soro de queijo, glicose, pectina) utilizados, não apresentando nenhum valor negativo. É importante salientar que neste momento não estava sendo verificado a concentração dos nutrientes, mas apenas o efeito desses nutrientes na produção da enzima. O caldo de cana-de-açúcar quando comparado ao soro de queijo se mostrou mais eficiente. O sulfato de amônio e a pectina afetam fortemente a produção da enzima, podendo ser verificado pelos elevados valores de suas estimativas (+209,86 e +121,51). Zetelaki-Horvath (1976) demonstrou também em sua pesquisa que o tipo e concentração de fontes de carbono e nitrogênio presentes no meio de cultivo afetam a produção de PG por microrganismos. Leuchtenberger Friese e Ruttloff (1989) estudando a influência de diferentes fontes de nitrogênio simples (inorgânico) e complexas (orgânicas) sobre o crescimento de *Aspergillus niger* e produção de PG verificaram também que na presença de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  houve maior síntese de PG com menor produção de biomassa. Kahna et al (1981)

relataram que o sulfato de amônio é a melhor fonte de nitrogênio inorgânico para pectinases fúngicas.

Com relação ao pH e agitação verificou-se que estes dois parâmetros afetam a produção da enzima.

O pH ótimo para a maioria das endo e exopoligalacturonases está entre 4,0 e 6,0. Behere et al (1993) encontraram pH ótimo igual a 5,0 para a produção de três poligalacturonases de *Aspergillus niger*. Barash, Zilberman e Marcus, (1994) e Sakai, Okushima e Yoshitake, (1984) encontraram um valor ótimo de 5,0 para as leveduras *Geotrichum candidum* e *Kluyveromyces fragilis* produzindo esta mesma enzima.

A agitação também teve uma influência na produção da enzima. O valor utilizado foi determinado através de dados da literatura, onde era citado uma faixa que variava de 100 a 300 rpm. El-Samragy, Chen e Zall (1988) determinaram a produção da enzima em 120 rpm e Beausejour, Lesuy e Ramalho (1981) trabalharam com 250 rpm e obtiveram bons resultados. Fiedurek, Ilczuk e Lobarzewski (1992), utilizando *Aspergillus niger* crescido, obtiveram produção máxima de PG com agitação de 200 rpm e verificaram que acima de 300 rpm esta produção diminuía. Estes resultados também mostraram que o excesso de aeração podia influenciar negativamente a síntese das pectinases.

Ficaram definidos os valores de 5,0 para o pH, e 150 rpm de agitação e foram mantidos a temperatura 28°C e período de 48 horas de fermentação em agitador com temperatura controlada.

#### 4.2 Planejamento fatorial fracionário saturado<sup>(5-2)</sup>

Utilizando-se o delineamento experimental do fatorial fracionário 2<sup>(5-2)</sup> (tabela 11) para verificação do efeito de níveis de concentração de fosfato ácido

de potássio e uréia, foi conduzido este experimento que após o período de fermentação, apresentou as concentrações de ácido galacturônico (mg/100ml) conforme Tabela 12.

**TABELA 11: Níveis dos fatores utilizados no delineamento experimental do fatorial fracionário 2<sup>(5-2)</sup>**

Ensaio N°	Caldo de Cana	Sulfato de Amônio	Pectina	Fosfato Potássio	Uréia
1	16	12	12	0,6	1,5
2	16	12	2	0,6	0,5
3	16	6	12	0,2	1,5
4	16	6	2	0,2	0,5
5	8	12	12	0,2	0,5
6	8	12	2	0,2	1,5
7	8	6	12	0,6	0,5
8	8	6	2	0,6	1,5

**TABELA 12: Concentrações de ácido galacturônico (mg/100) nos ensaios utilizados para delineamento fatorial fracionário 2<sup>(5-2)</sup>**

Ensaio N°	Ác. Galacturônico mg/100
1	8,1028
2	6,9838
3	7,8584
4	9,9002
5	10,3407
6	7,0867
7	9,2636
8	7,2507

Após aplicação da fórmula indicada para o cálculo dos contrastes ou efeitos de cada nutriente na produção da enzima, as estimativas dos contrastes para medir o efeito de cada nutriente estão apresentados na Tabela 13.

**TABELA 13: Estimativas dos contrastes entre os ensaios para cada nutriente (parâmetro)**

Nutriente	Contrastes
Caldo de cana	-1.0965
Sulfato de amônio	-1.7589
Pectina	+4.3441
Fosfato de potássio	-3.3851
Uréia	-6.1897

Verificou-se também neste experimento (Tabela 13) o forte efeito positivo da pectina na produção da enzima e os efeitos negativos da uréia e do fosfato ácido de potássio. Quando foi utilizado uréia e fosfato ácido de potássio para se testar melhoria do processo, os valores dos nutrientes caldo de cana de açúcar e sulfato de amônio foram afetados negativamente (Tabela 13 em relação a produção da enzima). Porém, como anteriormente estes nutrientes mostraram valores positivos no primeiro fatorial, ficaram definidos como fonte de carbono e nitrogênio juntamente com a pectina como elemento estimulador desta produção, bem como pH, agitação, temperatura e tempo de fermentação, anteriormente citados.

Produção de pectinases em microrganismos é influenciada pelas condições de cultivo, em particular pela composição do meio de cultura, tipo e concentração da fonte de carbono, pH e temperatura de cultivo, além de outros fatores. Zetelakihorvath (1982) verificou também esta influência da temperatura, pH, concentração da enzima, e concentração da substância sobre a produção de

pectina liase por *Aspergillus niger*. A indução da produção de PG por *Kluyveromyces fragilis*, pela adição de pectina ao meio contendo lactose, foi verificada em pesquisa de Garcia-Garibay, Gomez-Ruiz e Barzana (1987).

Alguns microrganismos produzem poligalacturonase constitutivamente, enquanto que em outros sua produção depende da presença de substâncias pécticas no meio de crescimento. Os microrganismos que produzem PG constitutivamente, o fazem na ausência de compostos pécticos, mas podem ter sua produção aumentada pela adição de pectina, pectato ou ácido galacturônico ao meio (Rexová-Benková e Marcovick, 1976). A PG de *Alternaria alternata* foi produzido em meio contendo glicose como única fonte de carbono. Entretanto a atividade da enzima foi intensificada quando se adicionou quantidades crescentes de pectina ao meio contendo glicose (Vasquez et al., 1985).

#### **4.3. Metodologia de análise de Superfície de Resposta 5<sup>3</sup>**

Na Tabela 14 encontram-se os resultados obtidos em cada um dos experimentos descritos no item 3.6 (Tabela 5). Com o objetivo de contornar problemas de heterogeneidade de variância na análise de variância, estes resultados foram transformados em logaritmo natural (Ln):

**TABELA 14: Concentração de ácido galacturônico (mg/100ml) obtidos após fermentação e utilizados para a análise de superfície de resposta 5<sup>3</sup>.**

EXP.Nº	mg/100 ml	Ln
1	22,783	3,126
2	17,309	2,850
3	4,102	1,410
4	4,086	1,407
5	2,718	1,000
6	5,740	1,747
7	6,125	1,812
8	5,682	1,737
9	1,847	0,613
10	2,515	0,922
11	23,419	3,153
12	6,093	1,807
13	3,215	1,168
14	12,440	2,521
15	1,278	0,245
16	1,257	0,229
17	1,230	0,207
18	1,321	0,278

A análise de variância correspondente, apresentou um Coeficiente de Determinação,  $R^2$ , com uma estimativa de 0,8511, um Coeficiente de Variação de 37,87% e um desvio de regressão (falha de ajuste) significativo ( $P=0,0001$ ). Este último valor se explica em função de que o quadrado médio do erro puro da análise de variância apresentou um valor muito baixo. O  $R^2$  apresenta um valor adequado, indicando uma boa relação dos dados com o modelo de regressão definido pela análise de variância. Entretanto, o coeficiente de variação é considerado alto e assim sendo, uma atenção maior deve ser dada ao analisar o conjunto dos dados, nesse caso, com o modelo usado as previsões e as tendências das respostas podem ser obtidas, mas não com muita segurança.

De qualquer forma pode-se verificar na análise de variância correspondente, que a variável caldo de cana-de-açúcar não afetou significativamente a produção da enzima ( $Prob > 0,6746$  e  $0,9220$  no individual e global respectivamente), e que as interações das variáveis sulfato de amônio e pectina, ( $X3 * X2$ ) bem como, os efeitos quadráticos delas ( $X3 * X3$  e  $X2 * X2$ ) afetam significativamente a produção da enzima ( $X2 * X2$  com  $P > 0,0013$ ;  $X3 * X3$  com  $P > 0,0128$  e  $X3 * X2$  com  $P > 0,035$ ) (lembrar que qualquer valor de P menor do que  $0,05$  é significativo). Este experimento mostrou, com certas restrições, que havia necessidade de definir melhor as concentrações das variáveis sulfato de amônio e pectina para atingir um máximo de atividade enzimática, já que seu efeito na atividade da enzima poligalacturonase foi significativo, conforme o demonstrado. Por outro lado, nos indicou que o caldo de cana-de-açúcar, como já foi mencionado, não afetou significativamente a produção da enzima e, portanto, pode ser utilizado em qualquer concentração entre  $9,17$  e  $14,83$  °Brix (ver delineamento experimental deste experimento), que a resposta, ou seja, a produção da enzima, não apresentará grandes variações. Caldo de cana foi testado por Minussi et al (1996) como fonte de carbono, e os autores obtiveram elevada produção de pectina liase em meio mineral suplementado com extrato de levedura.

A Figura 1 mostra objetivamente as interações das variáveis estudadas na produção indireta da enzima, através da produção de ácido galacturônico proveniente da hidrólise do ácido poligalacturônico no sobrenadante do meio de cultivo após a centrifugação. Nesta figura observa-se uma superfície ou área no centro do gráfico que define uma condição de concentração do sulfato de amônio e de pectina para suplementar o caldo de cana-de-açúcar ( $12$  °Brix) que origina uma produção mínima de ácido galacturônico, ou seja, de enzima. Verifica-se

também nesta figura que, as superfícies que definem valores máximos se encontram nos extremos, ou seja, quando a concentração da pectina e do sulfato de amônio se encontram em valores menores do que 2,0 e 1,0 g/100 ml, respectivamente, indicando a necessidade de ajustar melhor estas concentrações.

Freitas (1991), estudando as condições de cultivo de *Penicillium expansum* para produção de PG verificou que a maior atividade de PG foi obtida com cerca de 0,4% de pectina.

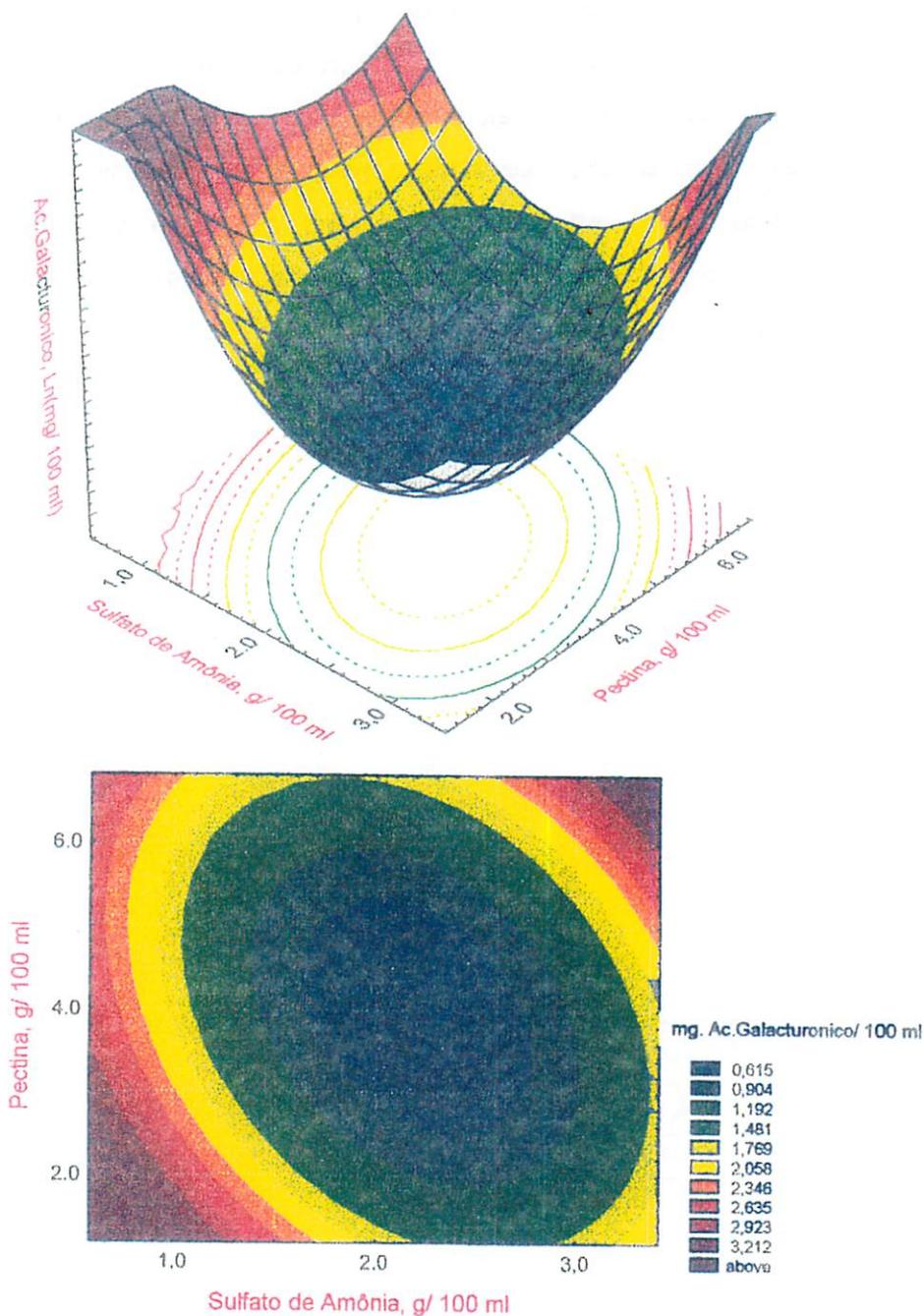


FIGURA 1 Efeito da suplementação do Caldo de Cana de Açúcar (12°Brix) com Sulfato de Amônia e Pectina na produção de Poligalacturonase de *Kluyveromyces*

#### 4.4 Planejamento de Análise de Superfície 5<sup>2</sup>

Os resultados obtidos de biomassa, proteína solúvel, ácido galacturônico e atividade enzimática podem ser vistos na Tabela 15.

**TABELA 15: Resultados da análise de superfície de resposta 5<sup>2</sup>**

EXP.Nº	Biomassa mg/ml	Prot.Sol. mg/ml	Ac.Galact. mg/ml	Ativ.Enz mg/ml/min
1	4,1	4,406	2,3742	0,0594
2	5,6	5,926	2,5247	0,0631
3	3,9	5,146	2,7979	0,0699
4	5,3	5,776	3,0653	0,0766
5	3,8	4,756	2,2938	0,0573
6	4,2	5,966	3,6114	0,0903
7	5,2	4,486	2,6530	0,0663
8	7,0	5,946	2,2967	0,0574
9	6,6	5,926	3,3328	0,0833
10	6,8	5,716	3,2771	0,0819
11	6,2	5,846	2,8313	0,0708

##### 4.4.1 Produção de Massa Celular

Com relação à produção de massa celular ou biomassa, pode-se observar na análise de variância correspondente que o coeficiente de determinação (R-Square) ( $R^2$ ) é 0,9620, o coeficiente de variação (C.V) corresponde a 6,24% e um desvio de regressão (falta de ajuste) de  $P=0,4595$ . Estes valores indicam que esta resposta (biomassa) se ajusta ao modelo de regressão adotado. Sabe-se que a medida que o valor do  $R^2$  se aproxima da unidade, indica uma excelente relação dos dados experimentais com a curva estabelecida pelo modelo utilizado, ou seja, o modelo é útil em fazer predições da variável resposta em função das variáveis independentes usadas. Neste caso este coeficiente de determinação pode ser considerado muito bom. Sabe-se que o coeficiente de variação sofre a influência

das dificuldades de padronização do inóculo, meios, e outros parâmetros que são de difícil controle. Este coeficiente na realidade dá uma idéia da precisão do experimento e em ensaios biológicos, podem ser considerados baixos, quando inferiores a 10%, médios quando entre 10 e 20% e altos de 20 a 30% (Pimentel, 1990). Como pode-se observar, o C.V. obtido na análise de variância corresponde a um valor de nível baixo e, portanto, excelente para sistemas biológicos. Considerando estes valores e o índice de desvio de regressão (falta de ajuste) não significativo ( $P=0,4595$ ), podemos afirmar que os dados experimentais obtidos se ajustam de modo adequado ao modelo de regressão adotado e que este poderá ser empregado para prever, com segurança, as tendências da resposta nas condições experimentais em estudo.

Verificando os efeitos das variáveis estudadas, observa-se que X1 (sulfato de amônio) no global afeta significativamente a produção de biomassa ( $P=0,0012$ ) e é muito significativo seu efeito quadrático ( $P=0,0002$ ). A concentração de pectina, no global, afeta de forma significativa a produção de biomassa ( $P=0,0090$ ). Não há entretanto, uma significância do efeito quadrático desta variável. A pectina, afeta significativamente a produção de biomassa quando atua individualmente apresentado um valor de  $P=0,0022$ , o que não acontece com sulfato de amônio que apresenta um valor de  $P=0,9472$ .

Na figura 2, estão representadas as superfícies de respostas da produção de massa celular, quando o caldo de cana-de-açúcar (12 °Brix) é suplementado com sulfato de amônio e pectina. Nesta figura observa-se uma superfície com uma resposta máxima (área azul), da qual se pode deduzir quais as concentrações que devem ser utilizadas de sulfato de amônio e de pectina para se obter a máxima produção de biomassa. Observando este gráfico, verificamos que quando o caldo de cana-de-açúcar é suplementado com sulfato de amônio numa

concentração de 0,3 g/100 ml e com 1,3 g/100 ml de pectina, obtêm-se concentrações de massa celular de *Kluyveromyces marxianus* acima de 6,610 g/L. Verificamos também que a medida que o caldo de cana-de-açúcar é suplementado com concentrações menores destes nutrientes, menor será a biomassa obtida. Esta situação acontece quando se utilizam concentrações menores que 0,8 g/ml de pectina e menores que 0,1 g/100 ml de sulfato de amônio. Há também, uma outra situação que nos fornece esta mesma resposta, quando as concentrações destes nutrientes participam com valores menores que 0,8 g/100 ml de pectina e acima de 0,5 g/100 ml de sulfato de amônio.

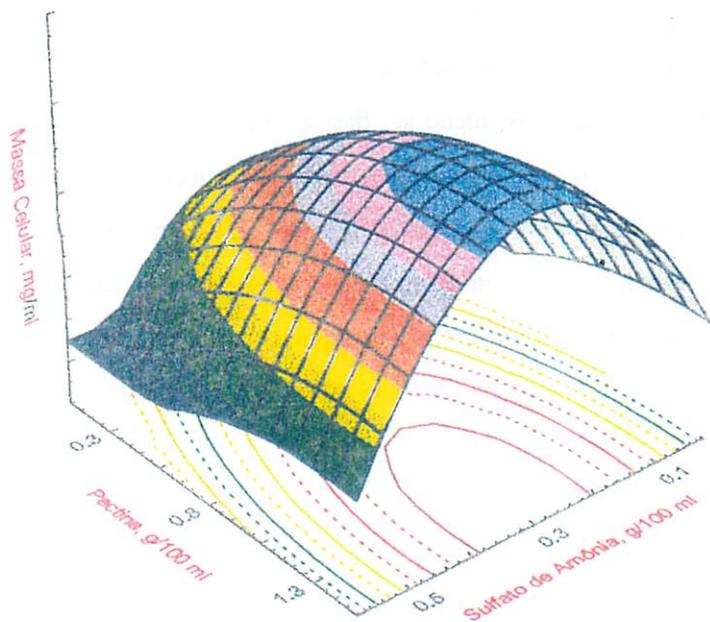


FIGURA 2. Biomassa de *Kluyveromyces* produzida em Caldo de Cana de Açúcar (12°Brix) suplementado com Sulfato de Amônia e Pectina.

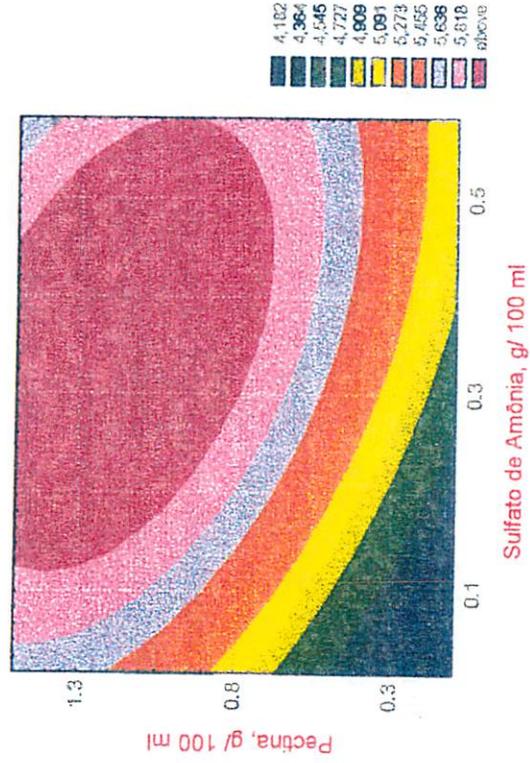
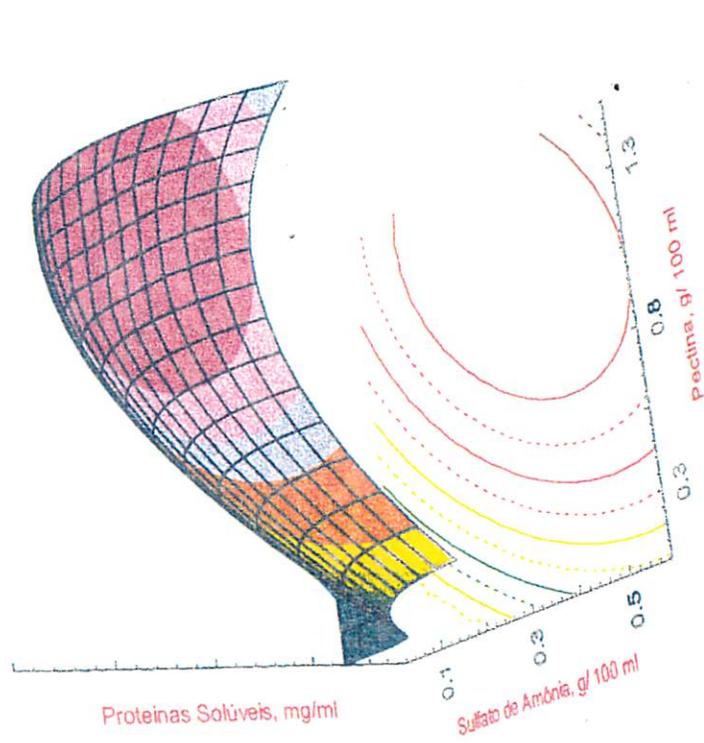
#### 4.4.2 Produção de Proteínas Solúveis

Com relação a produção de proteínas solúveis, pode-se observar na análise de variância correspondente que o coeficiente de determinação (R-Square) ( $R^2$ ) é 0,9533, o coeficiente de variação (C.V) corresponde a 3,50% e um desvio de regressão (falta de ajuste) de  $P=0,1795$ . Estes valores indicam que esta resposta se ajusta ao modelo de regressão adotado. O valor do  $R^2$  se aproxima da unidade e portanto indica uma excelente relação dos dados experimentais com a curva estabelecida pelo modelo. Sabe-se que o coeficiente de variação, sofre a influência das dificuldades de padronização do inóculo, meios, e outros parâmetros que são de difícil controle. Este coeficiente na realidade dá uma idéia da precisão do experimento. Como pode-se observar, o C.V. obtido na análise de variância corresponde a um valor de nível baixo e, portanto, excelente para sistemas biológicos (Pimentel, 1990). Considerando estes valores e o índice de desvio de regressão (falta de ajuste) não significativo ( $P=0,1795$ ), podemos afirmar que os dados experimentais obtidos se ajustam de modo adequado ao modelo e que este poderá ser empregado para prever, com segurança, as tendências da resposta nas condições experimentais em estudo.

Verificando os efeitos das variáveis estudadas, observamos que X1 (sulfato de amônio) no individual e no global afeta significativamente a produção de proteínas solúveis pelo *Kluyveromyces marxianus*, com valores de  $P=0,0080$  e  $0,0132$ , respectivamente. No caso da pectina também se apresenta afetando significativamente a produção de proteínas solúveis mostrando valores de  $P=0,0006$  no individual e de  $0,0016$  no global. Os efeitos quadráticos das duas variáveis também afetam significativamente esta produção, indicando valores de  $P=0,0362$  para o sulfato de amônio e de  $0,0134$  para a pectina. Não há

entretanto, uma significância da interação destas variáveis ao nível de  $P < 0,05$  mas, essa relação se torna significativa a um nível de  $P < 0,07$ .

Na figura 3, estão representadas as superfícies de respostas da produção de proteínas solúveis, quando o caldo de cana-de-açúcar, numa concentração de 12 °Brix, é suplementado com sulfato de amônio e pectina. Nesta figura observamos uma superfície com uma resposta máxima (área aprox. vermelha), da qual se pode deduzir quais as concentrações que devem ser utilizadas de sulfato de amônio e de pectina para suplementar o caldo de cana-de-açúcar e se obter a máxima produção de proteínas solúveis. Observando este gráfico verifica-se que quando o caldo de cana-de-açúcar é suplementado com sulfato de amônio numa concentração entre 0,3 e 0,5 g/100 ml, aproximadamente, e 0,8 a 1,5 g/100 ml de pectina, obteremos concentrações de proteínas solúveis produzidas por *Kluyveromyces marxianus* acima de 5,818 g/L. Verificamos também que a medida que o caldo de cana-de-açúcar é suplementado com concentrações menores de 0,8 g/100 ml de pectina, menor será a concentração de proteínas solúveis obtida, independente da concentração de sulfato de amônio empregada.



**FIGURA 3** Proteína Solúvel de *Kluyveromyces* produzida em Caldo de Cana de Açúcar (12°Brix) suplementado com Sulfato de Amônia e Pectina.

#### 4.4.3 Atividade enzimática da poligalacturonase

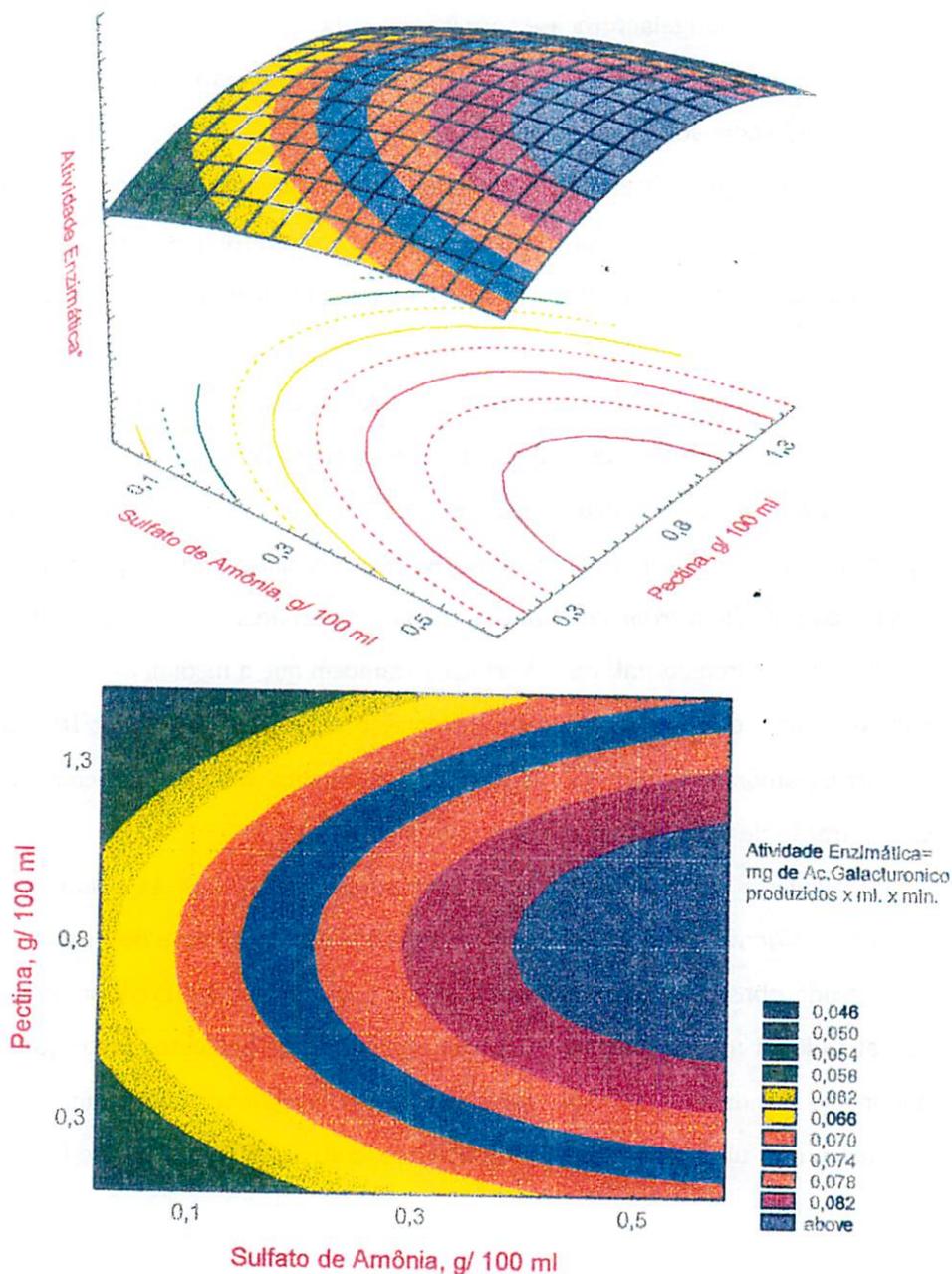
Com relação a atividade da enzima poligalacturonase, podemos observar na análise de variância correspondente que o Coeficiente de Determinação,  $R^2$ , (R-Square) é 0,8223, o Coeficiente de Variação (C.V) corresponde a 9,49% e um desvio de regressão (falta de ajuste) de  $P=0,5588$ . Estes valores indicam que esta resposta (atividade enzimática) se ajusta ao modelo de regressão adotado. O valor do  $R^2$  indica uma boa relação dos dados experimentais com a curva estabelecida pelo modelo utilizado. O coeficiente de variação, que na realidade dá uma idéia da precisão do experimento, corresponde a um valor de nível baixo e, portanto, excelente para sistemas biológicos (Pimentel, 1990). Considerando estes valores e o índice de desvio de regressão (falta de ajuste) não significativo ( $P=0,5588$ ), podemos afirmar que os dados experimentais se ajustam de modo adequado ao modelo de regressão adotado. Assim sendo, este poderá ser empregado para prever, com segurança, as tendências da resposta, ou seja, da atividade enzimática, nas condições experimentais empregadas.

Verificando os efeitos das variáveis estudadas, observa-se que  $X_1$  (sulfato de amônio) no individual afeta significativamente a atividade enzimática da poligalacturonase e que no global esta variável se torna significante num valor de  $P<0,06$  já que apresenta um  $P=0,0593$ . No caso da pectina se apresenta como não afetando de forma significante a atividade enzimática da poligalacturonase mostrando valores de  $P= 0,9138$  no individual e de  $0, 1287$  no global. O efeito quadrático do sulfato de amônio não afeta de forma significante,  $P=0,4035$ , a atividade da enzima, sendo que este mesmo efeito da variável pectina é significativo,  $P=0,0291$ . Não há entretanto, uma significância,  $P=0,8362$ , da interação destas duas variáveis.

Na figura 4, estão representadas as superfícies de respostas da atividade enzimática da poligalacturonase produzida pela *Kluyveromyces marxianus*, quando o caldo de cana-de-açúcar, numa concentração de 12 °Brix, é suplementado com sulfato de amônio e pectina.

Nesta figura observa-se uma superfície com uma resposta máxima (área azul claro), da qual pode-se deduzir quais as concentrações que devem ser utilizadas de sulfato de amônio e de pectina para suplementar o caldo de cana de açúcar com 12° Brix para se obter a máxima atividade da enzima em estudo. Observando este gráfico verifica-se que quando o caldo de cana-de-açúcar com 12° Brix é suplementado com sulfato de amônio numa concentração entre 0,40 e 0,58 g/100 ml, aproximadamente, e 0,50 a 1,05 g/100 ml de pectina, aproximadamente, obteremos a maior atividade enzimática da poligalacturonase produzida por *Kluyveromyces marxianus*, ou seja, atividades acima de 0,082 mg de ácido galacturônico/ ml/ min. Verifica-se também que a medida que o caldo de cana-de-açúcar é suplementado com concentrações menores que 0,40 g/100 ml de sulfato de amônio, menor será a atividade enzimática obtida, independente da concentração de pectina empregada.

Pode-se verificar pelos resultados apresentados, que as condições de cultivo de *Kluyveromyces marxianus* serão diferentes em função do produto que se pretenda obter. Os diferentes mecanismos bioquímicos da levedura serão ou não ativados a medida que as interações dos nutrientes presentes favoreçam em maior ou menor medida uma determinada via metabólica. Entretanto, pode acontecer que uma determinada condição de cultivo, favoreça a produção de vários produtos.



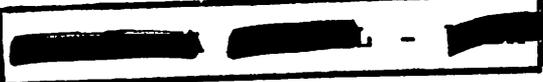
**FIGURA 4** Atividade da Poligalacturonase de *Kluveromyces* produzida em Caldo de Cana de Açúcar (12°Brix) suplementado com Sulfato de Amônia e Pectina.

Analisando, finalmente, as condições de produção de massa celular, proteínas solúveis e a enzima poligalacturonase com base na sua atividade, verificamos o seguinte: as melhores condições de produção de massa celular se apresentam para uma condição de concentração de 1,3 g/100 ml de pectina combinada com concentrações de sulfato de amônio variando entre 0,2 até 0,38 g/100 ml. Outras combinações podem ser obtidas da figura 2, como por exemplo, 0,3 g/100 ml de sulfato de amônio combinados com concentrações variáveis de pectina entre 0,85 até 1,5 g/100 ml.

No caso da produção de proteínas solúveis podemos deduzir da figura 3, que obteremos um máximo, quando o sulfato de amônio nas concentrações de 0,12 até 0,58 g/100 ml se combinem corretamente com concentrações de pectina entre 0,7 até 1,5 g/100 ml. Observa-se que à medida que a concentração de pectina diminui de 1,5 g/100 ml a faixa de concentração do sulfato de amônio vai sendo mais estreita.

Finalmente, a máxima atividade enzimática só acontecerá quando se combinem corretamente 0,5 até 1,05 g/100 ml de pectina com 0,40 até 0,58 g/100 ml de sulfato de amônio, sendo que a medida que a concentração do sulfato de amônio diminui a faixa de concentração de pectina vai se estreitando.

Para facilitar a análise, podemos fixar a concentração da pectina em 1,3 g/100 ml e combiná-la com 0,3 g/100 ml de sulfato de amônio. Verificamos que nesta situação a *Kluyveromyces marxianus*, nas condições experimentais de agitação, pH e concentração do caldo de cana-de-açúcar estudadas, produzirá uma quantidade máxima de massa celular e de proteínas solúveis (ver figuras 2 e 3). mas, estará sendo prejudicado quanto a produção da enzima (ver figura 4), já que neste caso somente poderíamos atingir uma atividade enzimática de aproximadamente 0,070 mg de ácido galacturônico/ml/min. Para alcançar uma



atividade máxima, ou seja, acima de 0,082 mg de ácido galacturônico/ml/min, as concentrações destes nutrientes deve estar entre 0,40 a 0,58 g de sulfato de amônio / 100 ml corretamente combinadas com 0,50 a 1,05 g de pectina / 100 ml.

Para obter uma máxima atividade enzimática e máxima concentração de proteínas solúveis, 0,75 g de pectina / 100 ml deveriam se combinar com no mínimo 0,50 g de sulfato de amônio / 100 ml (ver figura 4). Verifica-se que nestas condições ocorre um decréscimo na produção de massa celular (ver figura 2).

## 5- CONCLUSÃO

Pode-se concluir pelos resultados apresentados, que as condições de cultivo de *Kluyveromyces marxianus* serão diferentes em função do produto (biomassa, proteínas solúveis e atividade da enzima) que se pretende obter.

As condições ideais para produção de poligalacturonase por *Kluyveromyces marxianus* foram:

- Tempo de fermentação - 48 horas
- Temperatura - 28°C
- Agitação - 150 rpm
- pH - 5,0
- Sulfato de amônio em concentrações de 0,40 à 0,58 g/100 ml de caldo de cana-de-açúcar 12°Brix.
- Pectina em concentrações de 0,50 à 1,05 g/100 ml de caldo de cana-de-açúcar 12°Brix.

**ANEXOS**

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela</b>	<b>Página</b>
A 1 Análise de variância para a produção da enzima .....	54
A 2 Significância das variáveis na produção da enzima .....	54
A 3 Significância das variáveis na produção da enzima - Análise Global .....	54
A 4 Análise de variância para a produção de biomassa .....	55
A 5 Significância das variáveis na produção de biomassa .....	55
A 6 Significância das variáveis na produção de biomassa - Análise Global .....	55
A 7 Análise de variância para a produção de proteína total .....	56
A 8 Significância das variáveis na produção de proteína total .....	56
A 9 Significância das variáveis na produção de proteína total - Análise Global .....	56
A 10 Análise de variância para a produção da enzima .....	57
A 11 Significância das variáveis na produção da enzima .....	57
A 12 Significância das variáveis na produção da enzima - Análise Global .....	57

Tabela A 1 Análise de variância para produção da enzima

F.V	G.L	S.Q	Q.M.	F
Linear	3	1,597019	0,0976	0,2347
Quadrática	3	10,228104	0,6248	0,0031*
Interação	3	2,107823	0,1288	0,1534
Regressao T.	9	13,932946	0,8511	0,0159*
Desvio Reg.	5	2,434736	0,486947	0,0001*
Erro exp.	3	0,002679	0,000893	
Erro total	8	2,4374415		

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de F

Coefficiente de determinação ( $R^2$ )= 0,8511

Coefficiente de variação (C.V)= 37,8714

Tabela A 2 Significância das variáveis na produção da enzima

Significância das variáveis	Probabilidade
Linear	
$X_1$	0,6746
$X_2$	0,0566
$X_3$	0,7667
Quadrática	
$X_1 * X_1$	0,6789
$X_2 * X_2$	0,0013*
$X_3 * X_3$	0,0128*
Interação	
$X_2 * X_2$	0,7356
$X_3 * X_1$	0,5605
$X_3 * X_2$	0,0350*

Tabela A 3 Significância das variáveis na produção da enzima - Análise Global

Significância das variáveis	Probabilidade
X1	0,9220
X2	0,0052*
X3	0,0387*

Tabela A 4 Análise de variância para produção de biomassa

F.V	G.L	S.Q	Q.M.	F
Linear	2	3,707373	0,2542	0,0061*
Quadrática	2	10,320684	0,7076	0,0006*
Interação	1	0,002500	0,0002	0,8866
Regressao T.	5	14,030557	0,9620	0,0015*
Desvio Reg.	3	0,368231	0,122744	0,4594
Erro exp.	2	0,186667	0,093333	
Erro total	5	0,554898	0,110980	

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de F

Coefficiente de determinação ( $R^2$ )= 0,9620

Coefficiente de variação (C.V)= 6,2428

Tabela A 5 Significância das variáveis na produção de biomassa

Significância das variáveis	Probabilidade
Linear	
$X_1$	0,9472
$X_2$	0,0022*
Quadrática	
$X_1 * X_1$	0,0002*
$X_2 * X_2$	0,0870
Interação	
$X_2 * X_1$	0,8866

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de F

Tabela A 6 Significância das variáveis na produção de biomassa - Análise Global

Significância das variáveis	Probabilidade
X1	0,9220
X2	0,0052*
X3	0,0387*

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de F

**Tabela A 7 Análise de variância para produção de proteína total**

F.V	G.L	S.Q	Q.M.	F
Linear	2	2,882414	0,7405	0,0009*
Quadrática	2	0,630033	0,1619	0,0237*
Interação	1	0,198025	0,0509	0,0669
Regressao T.	5	3,710472	0,9533	0,0024*
Desvio Reg.	3	0,159352		0,1795
Erro exp.	2	0,022467		
Erro total	5	0,181819		

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de F

Coefficiente de determinação ( $R^2$ )= 0,9533

Coefficiente de variação (C.V)= 3,5021

**Tabela A 8 Significância das variáveis na produção de proteína total**

Significância das variáveis	Probabilidade
Linear	
$X_1$	0,0080*
$X_2$	0,0006*
Quadrática	
$X_1 * X_1$	0,0362*
$X_2 * X_2$	0,0134*
Interação	
$X_2 * X_1$	0,0669

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de F

**Tabela A 9 Significância das variáveis na produção de proteína total - Análise Global**

Significância das variáveis	Probabilidade
$X_1$	0,0132*
$X_2$	0,0016*

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de F

Tabela A 10 Análise de variância para produção da enzima

F.V	G.L	S.Q	Q.M.	F
Linear	2	0,000625	0,4943	0,0360*
Quadrática	2	0,000413	0,3262	0,0739
Interação	1	0,000002132	0,0017	0,8362
Regressao T.	5	0,001040	0,8223	0,0591
Desvio Reg.	3	0,000130	0,000043418	0,5588
Erro exp.	2	0,000094502	0,000047251	
Erro total	5	0,000225	0,000044951	

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de F

Coefficiente de determinação ( $R^2$ )= 0,8223

Coefficiente de variação (C.V)= 9,4980

Tabela A 11 Significância das variáveis na produção da enzima

Significância das variáveis	Probabilidade
Linear	
$X_1$	0,01336*
$X_2$	0,9138
Quadrática	
$X_1 * X_1$	0,4035
$X_2 * X_2$	0,0291*
Interação	
$X_2 * X_1$	0,8362

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de F

Tabela A 12 Significância das variáveis na produção da enzima - Análise Global

Significância das variáveis	Probabilidade
X1	0,0593
X2	0,1287

\* significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste de F

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALANA, A.; GABILONDO, A.; HERNANDO, F.; MORAGUES, M.D. Pectin lyase production by a *Penicillium italicum* strain. **Appl. Environm. Microbiol.**, v.55, p.1612-1616, 1989.

ALANA, A.; GABILONDO, A.; HERNANDO, F.; MORAGUES, M.D. Pectin lyase activity in a *Penicillium italicum* strain. **Appl. Environm. Microbiol.**, v.56, p.3755-3759, 1990.

BARACAT, M.C.; VANETTI, M.C.D.; ARAÚJO, E.F. Growth conditions of a pectinolytic *Aspergillus fumigatus* for degumming of natural fibers. **Biotechnol. Lett.**, v.13, p.693-696, 1981.

BARASH, J.; ZILBERMAN, E.; MARCUS, L. Purification of *Geotrichum candidum* endopolygalacturonase from culture and from host tissue by affinity chromatography on cross-linked polypectate. **Physiol. Plant Pathol.**, v. 25, p. 161-169, 1984.

BARON, A.; THIBAUT, J. F. Les enzymes pectolytiques. In: MOURANCHE, A.; COSTER, C. eds. **Hidrolases et dé polimérasés. Enzyme d intérêt industriel.** Paris: Gauthier-vollars, 1985. p. 143-64.

BARRET, A. J.; NORTHOTE, D. H. Apple fruit pectic substances. **Bioche. J.**, v.94, p.617-627, 1965.

BATT, C.A.; SINSKEY, A.J. Use of biotechnology in the roduction of single-cell protein. **Food Technol.**, v. 38, n.2, p. 108-111, 1989.

BAUMMAN, J.W. An application of enzyme in fruit juice technology. In: BIRCH, G.G.; BLAKEBROUGH, N.; PARKER, K.J. (Ed). **Enzyme and food processing.** Barking: Applied Science, 1981. cap.7.

BEAUSEJOUR, D.; LESUY, A.; RAMALHO, R.S. Batch cultivation of *Kluyveromyces fragilis* in cheese whey. **The Can. J. Chem. Eng.**, v.59, n.8, p.522-526, 1971.

BEHERE, A.; SATYANARAYAN, V.; PADWAL-DESAI, S.R. Separation and limited characterization of three polygalacturonases of *Aspergillus niger*. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 15, p. 158-191, 1993.

BOX, G.E.P.; DRAPPER, N.R. **Empirical model-building and response surfaces**. New York: John Wiley e Sons, 1987, 669p.

BROCK, T.D.; SMITH, D.W.E.; MADIGAN, M. Growth and its control. In: BROCK, T.D. **Biology of microorganisms**. New Jersey: Prentice-Hall INC., 1979. p.211-234.

CHAPMAN, H.D.; MORRIS, V.J.; SELVENDRAN, R.R.; ONEILL, M.A. Static and dynamic light-scatterin studies of pectic polissacarides from the middle lamellae and primary cell walls of cides apples. **Carbohydr. Res.**, v.165, p. 53-68, 1987.

DELANEY,R.A.M.; KENNEDY,R.; WALLEY,B.D. Composition of *Saccharomyces fragilis* biomass grow on lactose permeate. **J. Sci. Food Agric.**, v.26, n.8, p.1177-1186, 1975.

EL-REFAI, A.A.; METWALLI,S.M.; EL-SABAIFY, L.A. Influence of pH, inoculum concentration, aeration and growth period on production of pectolytic enzymes by *Aspergillus amamori* 16. **Chem. Microbiol. Technol.**,v. 8, p 115, 1984.

EL-SAMRAGY, Y.A.; CHEN, J.H.; ZALL, R.R. Amino acid and mineral profile of yeast biomass produced from fermentation of cheddar whey permeate. **Process Biochem.**, v. 23, n.1, p. 28-30, 1988.

EL-SAMRAGY, Y.A.; ZALL, R.R. Influence of sodium chloride on the activity of yeast in production of single-cell protein in whey permeate. **J. Dairy Sci.**, v.71, n.5. p. 1135-1140, 1988.

FALANGHE, H. Produção de microrganismos. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotechnologia: Tecnologia das fermentações**. São Paulo: Ed. Edgar Blucher LTDA, 1975, v.1, p.246-285.

AFIEDUREK, J.; ILCZUK, Z.; LOBARZEWSKI, J. Influence of the mycelium growth conditions on the production of amylytic and pectinolytic enzymes by *Aspergillus niger* C. **ACTA Biotechnol.**, v.9, p.355-361, 1989.

FIEDUREK, J.; ILCZUK, Z.; LOBARZEWSKI, J. Optimization of pectinolytic enzymes biosynthesis by immobilized mycelium of *Aspergillus niger* 71. **Zentralbl. Microbiol.**, v.147, p.15-21, 1992.

FORGAT, W.M.; KELLY, C. T. Pectic enzymes. In: FOGART, W.M., ed. **Microbial enzymes and biotechnology**. London, Applied Science Publishers, 1983. cap 3, p. 131-82.

FREITAS, L.E. Produção e caracterização parcial de poligalacturonase de *Penicillium expansum*. Viçosa: UFV. 67 p, 1991. (Mestrado em Microbiologia Agrícola).

GAO, S.; SHAIN, L. Characterization of an endopolygalacturonase produced by the chestnut blight fungus. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, v.45, p.169-179, 1994.

GARCIA-GARIBARY, M.; GOMEZ-RUIZ, L.; BÁRZANA, E. Studies on the simultaneous production of single cell protein and polygalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*. **Biotechnol. Lett.**, v. 6, p. 411-6, 1987.

GHILDYAL, N. P.; RMAKRISHNA, S.V; DEVI, P. N.; LOSANE, B. K.; ASTHANA, H.N. Large scale production of pectolytic enzyme by solid state fermentation. **J. Food Sci. Technol.**, v. 18, p. 248-51, 1981.

GUZMAN-JUAREZ, M. Yest protein. In: Hudson, B.J.F. **Development in food protein**. London: 1982., p.263-291.

ISHII, S. Purification and characterization of a factor that stimulates tissue maceration by pectolytic enzymes. **Phytopathology**, v. 67, p. 994-1000, 1977.

ISHII, S.; YOKOTSUKA, T. Pectin trans-eliminase with fruit juice clarifying activity. **J. Agr. Food Chem.**, v.19, p.958-961, 1971.

JOHNSTON, D.J.; WILLIAMSON, B. Purification and characterization of four polygalacturonases from *Botrytis cinerea*. **Mycol. Res.**, v.96, p.343-349, 1992.

KHANA, P.K.; SETHI, R.P.; TEWARI, H.K. Production of polygalacturonase and pectin methylesterase by *Aspergillus niger* C1. **Journal Res. Pundjab. Agric. Univ.**, v.18, p. 415-420, 1981.

LEUCHTENBERGER, A.; FRIESE, E.; RUTTLOFF, H. Variation of polygalacturonase and pectinesterase synthesis by aggregated mycelium of *Aspergillus mycelium* of *Aspergillus niger* in dependence on the carbon source. **Biothechnol. Lett.**, v. 11, p. 255-258, 1989.

LOWRY, O. H., ROSEMBROUGH, J.J.; FARR, A.L. e RANDALL, R.J. Protein measurement with the fenol reagent. **J. Biol. Chem.**, v. 193, p.265-275, 1951.

MANACHINI, P.L.; PARINI, C.; FORTINA, M.G. Pectic enzymes from *Aureobasidium pullulans* Lv 10. **Enzyme Microb.Technol.**, v.10, p.682-685, 1988.

McLELLAN, M.R.; KIME, R.W.; LIND, L.R. Apple juice clarification with the use honey and pectinase. **J. Food Sci.**, v.50, p.206-208, 1985.

MEHTA, A., MEHTA, P. Production of pectolytic and cellulolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* and *F. moniliforme* under different cultivation conditions. **Folia Microbiol.**, v.30. p.42-50, 1985.

MILLER, G.L. Use of dinitrosalicilic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, v. 31, p. 426-428, 1959.

MINUSSI, R.C.; SOARES-RAMOS, J.R.L.; COELHO, J.L.C. Sugar-cane juices pectin lyase in *Penicillium griseoroseum*. In: Reunião anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia molecular, 25, 1996, Caxambú. **Resumos...** Caxambú: SBBq, 1996. p.68.

OLSON Jr., J.C.; NOTTINGHAM, P.M. Temperatura. In: SILLIVER, J.H. **Ecologia Microbiana de los Alimentos**. Zaragoza: Acribia, 1980. p. 1-38.

PARDO, C; LAPENA, M.A.; GACTO, M. Purification and characterization of an extracellular exopolysaccharuronase from *Geotrichum lactis*. **Can. J. Microbiol.**, v.37, p. 934-978, 1991.

PIMENTEL, F.G. **Curso de estatística experimental**. Piracicaba: ESALQ/USP. 1990. 468p.

REXOVÁ - BENKOVÁ, L.; MARKOVIC, O. Pectic enzymes. In: TIPSON, R.S.; HORTON, D. eds. **Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry**.v.33. New York: Academic Press, 1976. p. 323-385.

ROMBOUTS, F.M.; PILNIK, W. Pectic enzymes. In: ROSE, A.H. ed. **Economic microbiology; microbial enzymes and bioconversions**. London: Academic Press, 1980 v. 5, p.227-282.

ROMBOUTS, F.M.; PILNIK, W. Pectinases and others cell-wall degrading enzymes of industrial importance. *Symbiosis*, v.2, p. 79-90, 1986.

ROMBOUTS, F.M.; PILNIK, W. Research on pectin depolymerases in the sixties. *CRC. Critical Ver. Fd.Technol.* v.3, p.1-26, 1972.

SAKAI, T.; OKUSHIMA, M.; YOSHITAKE, S. Purification crystallization and some properties of endo-poligalacturonase from *Kluyveromyces fragilis*. *Agric. Biol. Chem.*, v. 48, p.1951-1961, 1984.

SAKAI, T.; SAKAMOTO, T.; HALLAERT, J.; VANDAMME, E. J. Pectin, pectinase, and protopectinase: Production, properties and applications. *Adv. Appl. Microbiol.*, v.39, p.213-294, 1993.

SAKAI, T.; TAKAOKA, A. Purification crystallization and some properties of endo-poligalacturonase from *Aerobasidium pullulans*. *Agric. Biol. Chem.*, v. 49, p.449-458, 1984.

SANDHU, D.K.; WARAICH, M.K. Conversion of cheese whey to single-cell protein. *Biotechnol. e Bioeng.*, v.25, n.3, p.797-808, 1983.

SAULINIER, L.; BRILLOVET, J.M.; JOSELEAU, J.P. Structural studies of pectic substances from de pulp of grape berries. *Carbohydr. Res.*, v.182: p.63-78, 1988.

 SCHWAN, R.F e ROSE, A.H. Poligalacturonase production by *Kluyveromyces marxianus*: effect of medium composition. *Journal of Applied Bacteriology*, v.76, p.62-67, 1994.

SETHI, R.P.; KHANNA, P. K. ; THAPAR, V.K. Purification and properties of polygalacturonase and pectin methyl esterase. *J. Res. Punjab Agric. Univ.* v.18, p. 421-429, 1981.

SNYDER, H. E. Microbial sources of protein. IN: CHICHESTER, C.O.; MRAK, E.M.; Stewart, G.F. *Advances in Food Research*. New York: Academic Press, v.18, p.85-140, 1970.

STANIER, R. Y.; INGRAHAM, J. L. *The Microbial World.*, New Jersey: Prentice-Hall, 1986, p.196-212.

- THIBAUT, J.F.; RINAUDO, M. Interactions of mono- and divalent counterions with alkali- and enzyme deesterified pectins in salt-free solutions. **Biopolymers**, v. 24, p.2131-2143, 1985.
- TORZILLI, A. P. Isolation and partial characterization of pectic enzymes produced by *Blastocladia ramosa*. **Experiment. Mycol.**, v. 2, p. 1-11, 1978.
- UEDA, S.; FUJIO, Y.; LIM, J. Y. Production and some properties pectic enzymes from *Aspergillus oryzae* A3. **J. Appl. Biochem.**, 4:524-32, 1982.
- URSINI, R. Opening remarks. In: DAVIS, P. **Single-cell protein**. New York: Academic Press, 1974. p.1-2.
- VALSANGIACOMO, C.; GESSLER, C. Purification and characterization of an exopolygalacturonase produced by *Venturia inaequalis*, the causal agent of apple scab. **Physiol. Mol. Plant Pathol.**, v.40, p.63-77, 1992.
- VANANUVAT, P.; KINSELLA, J.E. Production of yeast protein from crude lactose by *Saccharomyces fragilis*. **J. Food Sci.**, v.40, n. 2, p. 336-341, 1975.
- VASQUEZ, C.; MARTINEZ, M.J; LAHOZ, R.; REYES, F. Inducción por pectina de distintas actividades pecticas del hongo *Alternaria alternata* durante su autolisis. **Microbiol. Espan.** v. 38, p. 53-59, 1985.
- WHITAKER, J.R. Pectic substances, pectic enzymes and formation in fruit juices. **Enz. Microbiol. Technol.**, v. 6, p.341-349, 1984.
- WICK, R.L., SCHOEDER, D.B. In vitro production of pectolytic and cellulolytic enzymes by *Fusarium tricinctum*. **Mycologia**, v.74, p.460-466, 1982.
- YOSHITAKE, S.; NUMATA, T.; KATSURAGI, T.; HOURS, R. A.; SAKAI, T. Purification and characterization of a pectin-releasing enzyme produced by *Kluyveromyces wckerhamii*. **J.Ferm. Bioeng.**, v.77, p.370-375, 1994.
- YUAN, G. F.; TSENG, T.G. Characterization and purification of extracellular poligalacturonase complex produced by *Phytophthora parasitica*. **Dast. Bot Bull. Academia Sinica**, v. 21, p. 141-154, 1980.
- ZETELAKIHORVATH, K. Factors affecting pectin lyase activity. **ACTA Alimentaria**, v. 11, p.21-29, 1982.