



COINTER PDVAgro 2020

V CONGRESSO INTERNACIONAL DAS CIÊNCIAS AGRÁRIAS

Edição 100% virtual | 02 a 05 de dezembro

ISSN:2526-7701 | PREFIXO DOI:10.31692/2526-7701

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS PARA SÍNTESE DE INULINASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE RESIDUOS AGROINDUSTRIALES PARA LA SÍNTESES DE INULINASA UTILIZANDO FERMENTACIÓN EN ESTADO SÓLIDO

BIOTECHNOLOGICAL POTENTIAL OF AGRO-INDUSTRIAL WASTE FOR THE SYNTHESIS OF INULINASE BY SOLID-STATE FERMENTATION

Apresentação: Comunicação Oral

Sergio Luis Yupanqui Mendoza¹; Priscila Vaz de Arruda²; Gracinda Marina Castelo da Silva³

DOI: <https://doi.org/10.31692/2526-7701.VCOINTERPDVAgro.0382>

RESUMO

A utilização de resíduos agrícolas e agroindustriais como fonte de matéria orgânica para obtenção de compostos de alto valor agregado, como a síntese enzimática, é hoje material de estudo para diversas investigações, devido ao fato de esses resíduos apresentarem alta disponibilidade, baixo custo e importante fonte de valor nutricional. Neste trabalho, é proposto o aproveitamento integrado do Resíduo Úmido Cervejeiro (RUC) e do melaço da cana-de-açúcar, ambos resíduos obtidos nas indústrias de cerveja e açúcar respectivamente; como substratos potenciais para a síntese de inulinasas por fermentação em estado sólido. Diferentes tratamentos foram utilizados para o melaço de cana, tais como, tratamentos com carvão ativado, EDTA e tratamento ácido, visando reduzir a concentração de minerais presentes em sua composição, permitindo assim aumentar a resposta da atividade enzimática e a concentração de biomassa. Posteriormente, foram realizados os testes de fermentação em estado sólido, os quais foram realizados com resíduo cervejeiro em diferentes concentrações percentuais de melaço de cana tratado. A utilização do tratamento com ácido sulfúrico 1 M foi definida como o melhor tratamento para o melaço de cana, modificando o pH inicial do meio de fermentação para 5,0 e o pH final para 4,0, obtendo uma atividade de inulinase total de $129,116 \pm 2,415 \text{ U.mL}^{-1}$ e concentração máxima de biomassa de $8,78 \text{ g.L}^{-1}$ em 24 h de fermentação submersa. Foi possível demonstrar um máximo de atividade da inulinase na fermentação sólida de $32,526 \pm 2,381 \text{ U.g}^{-1}$, utilizando uma concentração de melaço de cana tratado de 60% p.p⁻¹. Os resultados mostraram uma faixa de maximização da atividade entre 40% e 60% p.p⁻¹, valores consideravelmente importantes para estudos de otimização subsequentes, esses dados revelam o uso potencial de RUC e melaço de cana tratado como fontes potenciais de síntese de inulinase fornecendo uma fonte de nitrogênio, bem como uma importante fonte de carbono, respectivamente.

Palavras-Chave: Fermentação em estado sólido, inulinasas, resíduo úmido cervejeiro, leveduras.

¹ Programa de Pós-graduação em Processos Químicos e Biotecnológicos (PPGQB), Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), sergioluis@alunos.utfpr.edu.br

² Programa de Pós-graduação em Tecnologia em Biociências (PPGBio), Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), priscilaarruda@utfpr.edu.br

³ Doutora em Engenharia Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), gmarina@utfpr.edu.br

RESUMEN

La utilización de residuos agrícolas y agroindustriales como fuente de materia orgánica para la obtención de compuestos de alto valor agregado, como la síntesis enzimática, es hoy en día material de estudio para diferentes investigaciones, debido a que estos residuos poseen grande disponibilidad, bajo costo e importante fuente de valor nutricional. En este trabajo se plantea el uso integrado del Residuo Húmedo Cervecerero (RUC) y la melaza de caña de azúcar, ambos residuos obtenidos de la industria cervecera y azucarera respectivamente; como potenciales sustratos para la síntesis de inulinasas por fermentación en estado sólido. Se hizo uso de diferentes tratamientos a la melaza de caña, tales como, tratamientos con carbón activado, EDTA y tratamiento ácido, buscando disminuir la concentración de minerales presentes en su composición, permitiendo así aumentar la respuesta de actividad enzimática y la concentración de biomasa. Posterior a ello, fueron realizados los ensayos de fermentación en estado sólido que fueron llevados a cabo utilizando residuo cervecero a diferentes concentraciones porcentuales de melaza de caña tratada. Fue definido el uso del tratamiento con ácido sulfúrico 1 M como el mejor tratamiento a la melaza de caña modificando el pH inicial del medio de fermentación en 5,0 y pH final en 4,0, obteniendo un total de actividad inulinasa de $129,116 \pm 2,415 \text{ U.mL}^{-1}$ y una concentración máxima de biomasa de $8,78 \text{ g.L}^{-1}$ a las 24 h de fermentación sumergida. Fue posible evidenciar un máximo de actividad inulinasa en fermentación sólida de $32,526 \pm 2,381 \text{ U.g}^{-1}$, utilizando una concentración de melaza de caña tratada del 60% p.p⁻¹. Los resultados evidenciaron un rango de maximización de actividad entre el 40% y 60% p.p⁻¹, valores considerablemente importantes para estudios posteriores de optimización, estos datos revelan el uso potencial del RUC y la melaza de caña tratada como potenciales fuentes de síntesis de inulinasas aportando tanto fuente de nitrógeno así como una importante fuente de carbono respectivamente.

Palabras Clave: Fermentación en estado sólido, inulinasas, residuo húmedo cervecero, levaduras.

ABSTRACT

The use of agricultural and agro-industrial residues as a source of organic matter to obtain high benefit compounds, such as enzymatic synthesis, is nowadays study material for different investigations, because these residues have high availability, low cost and important source of nutritional value. In this work, the integrated use of the Wet Beer Residue (RUC) and the sugar cane molasses, both residues obtained from the beer and sugar industries respectively, is proposed; as potential substrates for the synthesis of inulinases by solid state fermentation. Different treatments were used for the cane molasses, such as, treatments with activated carbon, EDTA and acid treatment, seeking to reduce the concentration of minerals present in its composition, thus allowing increasing the response of enzymatic activity and the concentration of biomass. Subsequently, the solid-state fermentation tests was carried out, which were carried out using beer residue at different percentage concentrations of treated cane molasses. The use of 1 M sulfuric acid treatment was defined as the best treatment for cane molasses, modifying the initial pH of the fermentation medium to 5,0 and the final pH to 4,0, obtaining a total inulinase activity of $129,116 \pm 2,415 \text{ U.mL}^{-1}$ and a maximum biomass concentration of $8,78 \text{ g.L}^{-1}$ at 24 h of submerged fermentation. It was possible to demonstrate a maximum of inulinase activity in solid fermentation of $32,526 \pm 2,381 \text{ U.g}^{-1}$, using a concentration of treated cane molasses of 60% p.p⁻¹. The results showed a range of maximization of activity between 40% and 60% p.p⁻¹, considerably important values for subsequent optimization studies, these data reveal the potential use of RUC and treated cane molasses as potential sources of inulinase synthesis providing both a source of nitrogen as well as an important source of carbon respectively.

Keywords: Solid-state fermentation, inulinases, wet brewing residue, yeasts.

INTRODUÇÃO

O problema que envolve a geração e o descarte de resíduos agrícolas e agroindustriais, tem promovido o desenvolvimento de tecnologias destinadas para a transformação sustentável de recursos naturais, portanto, a aplicação de processos biotecnológicos aplicados ao seu aproveitamento, é considerada uma estratégia promissora devido à composição química variada

destes resíduos (CORREDOR; PÉREZ, 2018). Em definitiva, é de grande importância ter como enfoque o aproveitamento de resíduos sólidos orgânicos como potenciais fontes nutricionais de origem agrícola que proporcionem uma ótima rentabilidade econômica e sustentabilidade ambiental.

A síntese de enzimas de origem microbiana por fermentação, são hoje resultado de constantes avanços biotecnológicos. A importância do uso de enzimas não apenas reside em que é uma ferramenta potencial na redução do tempo do processo, mas também, pode modificar a aparência do produto, suas propriedades organolépticas e até seu valor nutricional (STEUDLER; WERNER; WALTHER, 2019).

O uso de resíduos agrícolas e agroindustriais é hoje um material de pesquisa para a produção de enzimas com interesse industrial utilizando fermentações sólidas (KAPOOR; PANWAR; KAIRA, 2016). É o caso do resíduo úmido cervejeiro (RUC) e do melaço de cana-de-açúcar, subprodutos gerados pela indústria cervejeira e pela indústria açucareira respectivamente, que podem ser utilizados e convertidos em importantes fontes de síntese enzimática. O RUC é um subproduto do processo de fabricação de cerveja, que é constituído principalmente por bagaço de malte e lúpulo residual, em sua composição contém grandes quantidades de componentes de fibras, carboidratos e proteínas (GOTTHARDI et al., 2018). Por outro lado, o melaço de cana-de-açúcar é o líquido viscoso escuro final, obtido durante a preparação do açúcar por cristalização repetida (VEANA et al., 2014), sendo este potencialmente utilizado como indutor na produção de inulinases devido à sua importante concentração de sacarose.

As inulinases têm aplicações importantes e tem ganhado grande importância na indústria de alimentos devido à sua capacidade hidrolítica, principalmente na produção de soros de frutose, bem como participar de processos de síntese de frutooligossacarídeos (compostos com potencial prebiótico) (OLIVEIRA et al., 2016). Um prebiótico é uma molécula que tem a capacidade de estimular o crescimento de bifidobactérias no nível intestinal e promover benefícios para a saúde dos consumidores.

Neste contexto, embora tenha sido relatado que uma ampla gama de micróbios produz inulinases utilizando fermentações sólidas, é importante focalizar a busca de novas alternativas para o uso fermentativo, que sejam de baixo custo e disponíveis em abundância.

Diante do exposto, o objetivo principal deste trabalho foi a produção de inulinases a partir da fermentação sólida de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 utilizando melaço de cana-de-açúcar e resíduo cervejeiro como novos substratos alternativos para sua síntese.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A inulinase é uma β -frutosidase não específica (inulinase: 2, 1- β -D-frutanfrutano-hidrolase; EC 3.2.1.7) que libera moléculas de frutose a partir de açúcares com unidades de frutose ligadas a β - (2, 1) no terminal não redutor (SELVAKUMAR; PANDEY, 1999). A inulinase é uma glicoproteína extracelular que hidrolisa também a sacarose, tanto dentro quanto fora da parede celular em leveduras (ARRIZON et al., 2011; SANTHARAM et al., 2017). Vários estudos realizados em relação à regulação da síntese de inulinase extracelular em leveduras pertencentes ao gênero *Kluyveromyces* concluíram que a enzima era induzível e sujeita à repressão catabólica (JAIN; JAIN; KANGO, 2012).

Mazutti et al. (2006), avaliou a produção de inulinase por fermentação em substrato sólido utilizando *Kluyveromyces marxianus* NRRLY-7571. O meio sólido consistiu de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com melaço de cana e licor de milho. Da mesma forma Abd el Aty et al., (2014), conseguiram otimizar a produção de inulinases por *Aspergillus terreus* por meio da fermentação sólida utilizando folhas de alcachofra (ricas em inulina) como substrato. Os trabalhos encontrados na literatura afirmam a característica induzível dessas enzimas, sendo a sacarose e a inulina os substratos responsáveis por sua síntese.

O melaço de cana-de-açúcar, subproduto industrial da fabricação de açúcar, poderia contribuir como fonte de carbono devido à sua alta concentração de sacarose (indutor da inulinase), porém seu uso é limitado devido à sua alta composição de compostos inibidores da fermentação. O melaço é um substrato bastante complexo e os componentes minerais dentro da sua composição podem ser responsáveis pela inibição da produção da inulinase, ou ainda, dificultar sua posterior purificação devido a formação de precipitados no meio de fermentação (VIDRA; TÓTH; NÉMETH, 2017).

Por outro lado, o resíduo úmido cervejeiro, é um substrato rico em fibras e possui uma importante fonte proteica em sua estrutura (MATHIAS et al., 2017).

Considerando uma forma de tratamento do melaço de cana-de-açúcar, que está associada ao aumento da atividade enzimática, acoplando a natureza proteica do resíduo úmido da cerveja (RUC), ambos se apresentam como fontes importantes para a síntese de inulinases.

METODOLOGIA

As análises da pesquisa de natureza quantitativa-experimental foram realizadas no Laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Campus Toledo/PR. O procedimento experimental constou de duas fases, a primeira baseada na determinação do melhor tratamento para o melaço de cana, que, como dito anteriormente, além

de ter a sacarose como indutor enzimático, também apresenta em sua composição substâncias inibidoras da síntese enzimática. A segunda fase consistiu em testes de fermentação sólida utilizando RUC e melão tratado, para determinar se existe evidência de produção de inulinase utilizando ambos os substratos.

Substratos

Foram utilizados como substratos industriais o resíduo úmido cervejeiro (RUC), fornecido pela empresa INAB (Indústria Nacional de Bebidas) - Toledo/PR, em conjunto com o melão de cana-de-açúcar fornecido pela empresa de Açúcar Santa Terezinha Unidade Goioere- Moreira/PR.

Microrganismo

O microrganismo utilizado na fase experimental foi a levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 (NCYC 587), da Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello, Campinas – SP.

O meio de manutenção da levedura foi o Meio YPS Agar “*Yeast Peptone Sucrose-Agar*”, contendo extrato de levedura 2,5 g.L⁻¹, peptona 5,0 g.L⁻¹, sacarose 15,0 g.L⁻¹ e ágar 20,0 g.L⁻¹, a 4 ° C em refrigeração (ONILUDE et al. 2012).

Para o crescimento celular foi realizado um pre-inóculo e inóculo. O crescimento do pre-inóculo foi realizado utilizando o caldo YPS contendo as mesmas concentrações em tubos de 50 mL, volume de 10 mL. O meio foi inoculado com uma alça de cultura e incubado a 30 °C por 24 h. O meio para o inóculo foi preparado seguindo o procedimento desenvolvido por Treichel (2004), cada tubo de ensaio com caldo YPS foi transferido para um frasco Erlenmeyer de 500 mL contendo 100 mL de meio, ajustando o pH a 6,8 e incubado a 30 °C e 150 rpm por 24 h. A composição do meio para o inóculo foi a seguinte (g.L⁻¹): Sacarose (20,0), Extrato de levedura (5,0), K₂HPO₄ (1,5), KCl (1,15) e MgSO₄ .7H₂O (0,65).

Primeira fase: Ensaios de tratamento

A primeira parte do procedimento experimental consistiu no pré-tratamento antes do processo de fermentação sólida. Ambos os substratos (RUC e melão de cana) foram tratados de forma diferente. O RUC utilizado na fermentação, constituído principalmente de bagaço de malte, lúpulo residual e outros aditivos, foi lavado com água para retirar os resíduos do processo de fabricação de cerveja, para então ser submetido à secagem por 24h a 50 °C. Posteriormente, foi triturado em um moinho de facas e peneirado até um tamanho de partícula de 2 mm. O material não utilizado na fase experimental foi mantido refrigerado a -4 ° C, para evitar contaminação microbiana.

Por outro lado, o melão de cana-de-açúcar foi submetido a tratamento para remoção de

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAS

compostos que afetam negativamente a fermentação. Foram avaliados três métodos de tratamento: Tratamento com carvão ativado, Tratamento com EDTA e Tratamento com ácido sulfúrico.

A avaliação dos três tratamentos foi realizada em frascos Erlenmeyer de 500 mL, levando-se em consideração os resultados reportados por Treichel, (2004) com algumas modificações, o meio líquido foi composto conforme especificado na Tabela 1.

Tabela 01: Composição do meio de fermentação para o tratamento

Componente	Concentração (g.L ⁻¹)
Melaço de cana-de-açúcar	100
Extrato de levedura	6
Peptona	6

Fonte: Adaptado de Treichel (2004).

A temperatura de incubação foi mantida em 36 °C (KABKE, 2002), em frascos agitados em uma incubadora refrigerada com agitação orbital, com rotação de 150 rpm e pH inicial 5,0. A cada frasco foi adicionado 10% de inóculo. A resposta atividade enzimática foi avaliada às 72 h de fermentação, enquanto a concentração de biomassa foi avaliada durante as 24, 48 e 72 h.

Pré-tratamento com carvão ativo

A análise foi realizada em carvão ativado em pó (Cromoline Química Fina). Em um frasco Erlenmeyer de 500 mL, foram colocados 150 mL de melaço de cana diluído na concentração especificada na Tabela 1. Conseqüentemente, o carvão ativado em pó foi adicionado nas seguintes concentrações: 3, 5, 8 e 10% p.v⁻¹. A solução foi mantida em agitação por 90 min a 150 rpm com 60 ° C. Após o tempo de tratamento, o caldo foi filtrado em papel filtro e centrifugado a 5000 rpm por 15 min. Foram retirados 100 mL do caldo filtrado e adicionados peptona e extrato de levedura nas concentrações correspondentes, para então serem submetidos à esterilização e utilizados posteriormente na fermentação.

Pré-tratamento com EDTA

A análise EDTA foi realizada utilizando a metodologia modificada de Roukas (1998). Em frascos Erlenmeyer de 500 mL, foram colocados 150 mL de melaço, como no caso anterior, o pH foi ajustado para 5,5, a solução foi aquecida a 80 ° C por 15 min. Imediatamente, quando o líquido ainda estava quente, foram adicionadas concentrações de EDTA a 100, 200, 300 e 400 ppm. A solução foi mantida em repouso por 24 h e centrifugada a 5000 rpm. O líquido

sobrenadante foi transferido para frascos Erlenmeyer para uso posterior na fermentação.

Pré-tratamento com Ácido Sulfúrico

Para o análise com ácido sulfúrico foi realizada com base nos resultados descritos por Sguarezi et al. (2009) e Roukas (1998). Dois tratamentos ácidos foram aplicados em diferentes condições de pH. A solução de 150 mL de melaço de cana diluída foi ajustada para um pH inicial de 5,0 usando ácido sulfúrico 1 M, a solução do segundo tratamento do melaço foi ajustada para um pH inicial de 3,0, ambas as soluções foram mantidas em repouso por 24 h a 24 °C, para então ser centrifugado a 5000g por 15 min. Um ajuste final de pH foi realizado com o primeiro tratamento ajustado para um pH final de 4,0 e o segundo ajustado para um pH final de 5,5. A solução de melaço tratada foi utilizada na fermentação líquida.

Ensaio de fermentação sólida

Para avaliar a produção enzimática, três testes de fermentação sólida foram avaliados variando a concentração percentual de melaço de cana previamente tratado. Os testes foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL, compostos de RUC tratado e melaço de cana em três concentrações diferentes 10, 40 e 60% p.p⁻¹. O terceiro ensaio consistiu em RUC sem adição de melaço. O pH do meio sólido foi ajustado para 5,5 e a umidade inicial para 65% p.p⁻¹, este último parâmetro foi ajustado de acordo com o volume adicionado de melaço. Cada meio sólido foi esterilizado a 121 °C por 20 min, para então ser inoculado com 3 mL de inóculo. Os frascos foram incubados por 72 h a 35 °C, os experimentos foram realizados em triplicata, sendo a variável de atividade inulinase a variável resposta.

O extrato enzimático produzido foi extraído de acordo com a metodologia proposta por Mazutti et al., (2006). Foi adicionado a cada frasco Erlenmeyer utilizado na fermentação sólida, tampão acetato de sódio (0,1 M; pH 4,8) em uma proporção equivalente a dez vezes por grama de suporte utilizado (1:10) (v.p⁻¹), para depois ser incubada a 30 °C com agitação a 150 rpm por 30 min. A solução foi filtrada através de papel de filtro Whatman N° 1 e o sobrenadante foi utilizado como a preparação enzimática em bruto. A atividade enzimática foi analisada a partir do sobrenadante obtido após a filtração a vácuo.

Determinação da Atividade Inulinase

A atividade da inulinase foi determinada seguindo a metodologia proposta por Xiong et al., (2007), apresentando algumas modificações. O ensaio foi realizado utilizando 0,5 mL de extrato enzimático adequadamente diluído com solução tampão acetato e adicionado a 4,5 mL de solução de sacarose (2%, p.p⁻¹) em 0,1 mol/l de tampão acetato a pH 4,8, e 50 °C durante 10 min. A reação foi interrompida utilizando água em ebulição por 10 min. Da solução de reação enzimática foi extraído 0,5 mL o qual serviu para medir a concentração de açúcares na forma

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAS

de frutose pelo método de DNS. A curva de calibração foi realizada utilizando soluções de frutose de concentração conhecida. Uma unidade de atividade da inulinase é definida como a quantidade de enzima, que produz 1 mole de frutose sob as condições do ensaio. Os resultados da determinação da atividade da inulinase foram apresentados em unidades de atividade/gramas de substrato sólido ($U.g^{-1}$) e para os ensaios de fermentação em fase líquida ($U.mL^{-1}$).

Determinação da Concentração de Biomassa

O crescimento da levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907, medida por meio da concentração de biomassa foi acompanhado por medida da densidade ótica a 600 nm em espectrofotômetro. Antes da medição da concentração celular foi realizado uma curva padrão de concentração de biomassa conhecida calculada em peso seco. A concentração de biomassa foi determinada utilizando a equação obtida por regressão linear dos dados entre peso seco e a absorvância a 600 nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ensaio de tratamento

A Tabela 2 mostra os resultados comparativos dos três tratamentos realizados no melaço de cana-de-açúcar. Todos os resultados de atividade enzimática e concentração de biomassa por tratamento utilizado não são apresentados neste trabalho, entretanto, o tratamento que obteve a maior atividade enzimática é apresentado individualmente, e da mesma forma, que apresentou o melhor perfil de crescimento microbiano permitindo uma comparação dos três tratamentos.

Tabela 02: Resultados comparativos dos melhores tratamentos para o melaço de cana-de-açúcar baseados na atividade da inulinase.

Tratamento utilizado	Atividade enzimática ($U.mL^{-1}$)
Sem tratamento	$32,286 \pm 2,824$
Tratamento com carvão ativado 8%	65.616 ± 3.705
Tratamento com EDTA 200 ppm	57.648 ± 3.276
Tratamento com ácido sulfúrico. pH inicial 5,0 /pH final 4,0	$129,116 \pm 2,415$

Fonte: Própria (2020).

Como pode ser observado na Tabela 02, a utilização de um tratamento de melaço de cana resultou em aumento da atividade enzimática em todos os ensaios de tratamento, o que corroborou o que foi mencionado na fundamentação teórica da presença de compostos inibitórios no melaço. Segundo Vidra et al. (2017), são necessários tratamentos prévios de melaço de cana antes de serem utilizados em processos de fermentação, devido à sua alta

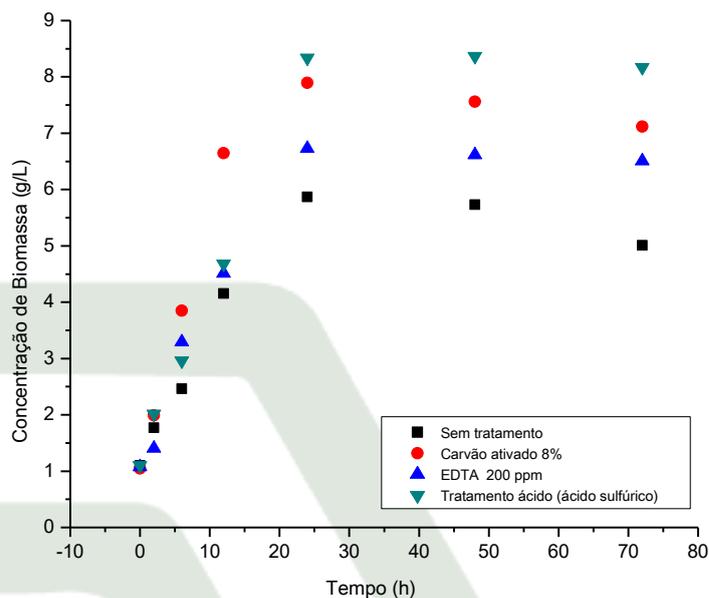
concentração de compostos como metais pesados como ferro, zinco, cobre, manganês, magnésio e cálcio (ROUKAS, 1998).

O tratamento que apresentou melhor perfil de atividade inulinase foi o tratamento com ácido sulfúrico como regulador de pH (pH inicial 5,0 /pH final 4,0). Com este tratamento, foi possível atingir uma atividade máxima de $129,116 \pm 2,415 \text{ U. mL}^{-1}$, consideravelmente superior à atividade enzimática obtida sem tratamento. Uma forma de explicar os resultados obtidos pode ser devido à capacidade dos ácidos em formarem sulfatos na presença de compostos metálicos, que depois serão removidos do meio de fermentação por centrifugação. É importante ressaltar que existem outras alternativas para tratamentos ácidos, como o ácido fosfórico, que possui propriedades complexantes, contribuindo para a clarificação do meio de fermentação e aumentando a atividade enzimática.

Estudos de produção de enzimas utilizando melão também sugerem o uso de tratamentos ácidos para melhora da atividade, exemplo disso são os resultados relatados por Golunski et al., (2017), que utilizou tratamentos ácidos para a otimização da produção de inulinase, ou também os resultados reportados por Tyagi e Suresh, (2016), que utilizaram tratamentos com ácido como modificador do pH para maximizar a produção de celulose; todavia, também podem ser encontrados na literatura estudos que afirmam o uso do carvão ativado como a melhor opção de tratamento. No presente trabalho, utilizando uma concentração de $8\% \text{ p.v}^{-1}$ de carvão ativado, foi alcançada uma atividade máxima de $65.616 \pm 3.705 \text{ U. mL}^{-1}$, valor acima do apresentado com o meio sem tratamento. O carvão ativado possui propriedades adsorventes em relação à sua porosidade, amplamente utilizado para a eliminação de impurezas dissolvidas em solução. Treichel (2004) definiu que o uso de carvão ativado ANF na concentração de 8% apresentou maior atividade enzimática sobre os tratamentos ácidos e terra diatomácea.

Por outro lado, assim como nas análises de tratamento baseadas na atividade enzimática, o monitoramento da concentração de biomassa também foi realizado em um intervalo de tempo de 72 h. A Figura 01 apresenta o gráfico comparativo dos três tratamentos em função da concentração de biomassa expressa em g.L^{-1} . Foi possível evidenciar que o crescimento celular é exponencial nas primeiras 24 horas de fermentação em todos os tratamentos. A concentração de biomassa atingiu no máximo $8,78 \text{ g.L}^{-1}$ utilizando o tratamento com ácido sulfúrico, seguido do tratamento com carvão ativado, que apresentou concentração máxima de $7,89 \text{ g.L}^{-1}$ e por último o tratamento com EDTA com o que foi obtido um máximo de $6,72 \text{ g.L}^{-1}$, valores medidos às 24 h de fermentação.

Figura 1: Gráfico comparativo do monitoramento da concentração de biomassa ao longo do tempo utilizando diferentes tratamentos de melão de cana-de-açúcar.



Fonte: Própria (2020).

Todas as fermentações com tratamento apresentaram aumento na taxa de crescimento celular, o valor máximo de concentração celular no teste sem tratamento foi de $5,87 \text{ g.L}^{-1}$. Os resultados corroboram a eficácia dos tratamentos sobre o crescimento celular, que está intimamente ligado à síntese enzimática.

Com base nos resultados obtidos no tratamento do melão de cana-de-açúcar, o uso de ácido sulfúrico 1 M foi definido como o melhor tratamento, variando o pH inicial para 5,0 seguido de um ajuste final do pH de 4,0. A análise da fermentação sólida foi realizada utilizando melão de cana tratado com este procedimento.

Ensaio de fermentação sólida

Os resultados correspondentes aos testes de fermentação sólida variando a concentração de melão de cana tratado em função da atividade da inulinase são apresentados na Tabela 3 e Figura 2.

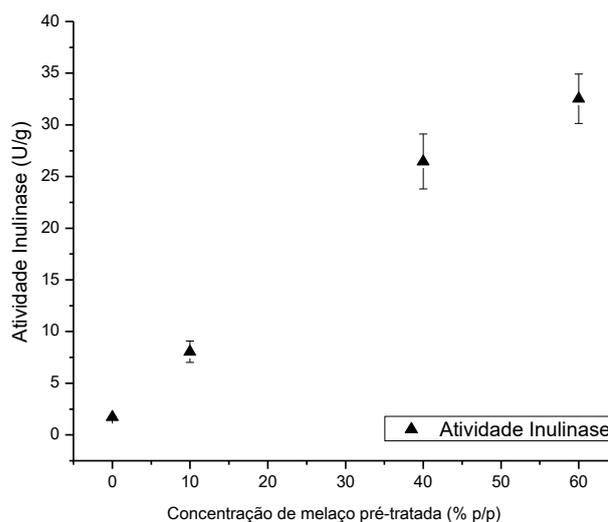
Os dados de atividade da inulinase relatados neste estudo são encorajadores, mostrando uma resposta clara da atividade enzimática, usando apenas um meio de fermentação simples composto de RUC e melão. Um máximo de $32,5 \text{ U.g}^{-1}$ de atividade foi obtido utilizando uma concentração de melão de 60% p.p⁻¹. Com 40% p.p⁻¹, foi possível obter atividade em torno de $26,4 \text{ U.g}^{-1}$.

Tabela 3: Dados de atividade inulinase em relação às concentrações de melaço tratado utilizando na fermentação sólida

Concentração de melaço de cana tratada % p.p ⁻¹	Atividade enzimática inulinase U.g ⁻¹
0	1,721 ± 0,056
10	8,044 ± 1,035
40	26,451 ± 2,663
60	32,526 ± 2,381

Fonte: Própria (2020).

Os dados podem significar uma margem para otimização da atividade entre uma faixa de concentração de melaço de 40 a 60% p.p⁻¹. É importante levar em consideração que os dados apresentados nesta seção não correspondem aos dados otimizados da atividade enzimática.

Figura 2: Representação gráfica do aumento da atividade da inulinase em relação ao aumento da concentração do melaço de cana tratado

Fonte: Própria (2020).

Trabalhos na literatura mostram o efeito de diferentes substratos para a produção de inulinas na fermentação sólida utilizando desenhos experimentais para a maximização dessa resposta, Onilude et al., (2012), relatou atividade inulinase da levedura *Saccharomyces sp.* em torno de 78,29 U.g⁻¹ utilizando farelo de trigo e 22,47 U.g⁻¹ quando foram utilizadas cascas de laranja, Mazutti et al., (2010), relataram atividade inulinase em 463 U.g⁻¹ utilizando bagaço de cana e farelo de soja como substratos e *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, como microrganismo produtor. É notável a versatilidade da literatura encontrada correspondente à atividade enzimática, utilizando diferentes condições de fermentação, diferentes substratos e até mesmo diferentes métodos estatísticos para maximizar a resposta da atividade.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos na experimentação, foi evidenciada uma clara resposta da atividade enzimática inulinase em presença de melaço de cana e resíduo cervejeiro. Definiu-se que o melhor tratamento para o melaço de cana foi utilizando ácido sulfúrico 1 M, ajustando o pH inicial para 5,0 e o final em 4,0, com o qual se obteve uma nítida melhora da atividade da inulinase em função da concentração de biomassa. A atividade inulinase em meio de fermentação sólido atingiu valores entre 26,4 U.g⁻¹ e 32,5 U.g⁻¹ quando foram utilizados 40 e 60% p.p⁻¹ de melaço de cana tratado, respectivamente. A conformação estrutural do resíduo cervejeiro, composto principalmente por proteínas e melaço de cana-de-açúcar previamente tratado, como indutor enzimático, foram candidatos promissores para a síntese de inulinase. A utilização de modelos estatísticos para a otimização da resposta da atividade, otimizando variáveis importantes na fermentação sólida como umidade, temperatura, pH e outras fontes de substratos de origem agroindustrial, é proposta como objetivo para a maximização da produção de inulinase para trabalhos posteriores.

REFERÊNCIAS

- ABD EL ATY, A. A.; WEHAIDY, H. R.; MOSTAFA, F. A. Optimization of inulinase production from low cost substrates using Plackett–Burman and Taguchi methods. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p. 261–268, fev. 2014.
- ARRIZON, J. et al. Purification and substrate specificities of a fructanase from *Kluyveromyces marxianus* isolated from the fermentation process of Mezcal. **Bioresource Technology**, v. 102, n. 3, p. 3298–3303, fev. 2011.
- CORREDOR, Y. A. V.; PÉREZ, L. I. P. Aprovechamiento de Residuos Agroindustriales en el mejoramiento de la calidad del ambiente. **Revista Facultad de Ciencias Básicas**, p. 59–72, 15 abr. 2018.
- GOLUNSKI, S. et al. Purification of inulinases by changing the ionic strength of the medium and precipitation with alcohols. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 1, p. 57–63, mar. 2017.
- GOTTHARDI, A. et al. **Aproveitamento do bagaço de malte no desenvolvimento de pão de mel**. In: 6º CONGRESSO INTERNACIONAL DE TECNOLOGIAS PARA O MEIO AMBIENTE. Bento Gonçalves – RS, Brasil: 2018.
- JAIN, S. C.; JAIN, P. C.; KANGO, N. Production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* using dahlia tuber extract. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, n. 1, p. 62–69, 2012.
- KABKE, K. C. P. Otimização da produção de inulinase em meio industrial através de linhagens de *Kluyveromyces marxianus*. 2002. 77p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP. Disponível em: <<http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/255019>>. Acesso em: 23 set. 2020.

KAPOOR, M.; PANWAR, D.; KAIRA, G. S. Bioprocesses for Enzyme Production Using Agro-Industrial Wastes. In: **Agro-Industrial Wastes as Feedstock for Enzyme Production**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 61–93.

MATHIAS, T. R. DOS S. et al. Brewery Waste Reuse for Protease Production by Lactic Acid Fermentation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 55, n. 2, p. 218–224, jun. 2017.

MAZUTTI, M. et al. Optimization of inulinase production by solid-state fermentation using sugarcane bagasse as substrate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 1, p. 56–59, jun. 2006.

MAZUTTI, M. A. et al. Optimization of inulinase production by solid-state fermentation in a packed-bed bioreactor. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 85, n. 1, p. 109–114, 2010.

OLIVEIRA, L. P. DE A. DE et al. Agave syrup as a substrate for inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 38, n. 3, p. 283, 8 dez. 2016.

ONILUDE, A. A.; FADAUNSI, I. F.; GARUBA, E. O. Inulinase production by *Saccharomyces* sp. in solid-state fermentation using wheat bran as substrate. **Annals of Microbiology**, v. 62, n. 2, p. 843–848, jun. 2012.

ROUKAS, T. Pretreatment of beet molasses to increase pullulan production. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 8, p. 805–810, nov. 1998.

SANTHARAM, L. et al. Modeling of exo-inulinase biosynthesis by *Kluyveromyces marxianus* in fed-batch mode: correlating production kinetics and metabolic heat fluxes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 101, n. 5, p. 1877–1887, mar. 2017.

SELVAKUMAR, P.; PANDEY, A. Solid state fermentation for the synthesis of inulinase from *Staphylococcus* sp. and *Kluyveromyces marxianus*. **Process Biochemistry**, v. 34, n. 8, p. 851–855, 1 out. 1999.

SGUAREZI, C. et al. Inulinase Production by Agro-Industrial Residues: Optimization of Pretreatment of Substrates and Production Medium. **Food and Bioprocess Technology**, v. 2, n. 4, p. 409–414, dez. 2009.

STEUDLER, S.; WERNER, A.; WALTHER, T. It Is the Mix that Matters: Substrate-Specific Enzyme Production from Filamentous Fungi and Bacteria Through Solid-State Fermentation. 2019.

TREICHEL, H. **Estudo da otimização da produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em meios industriais pré-tratados**. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos.—Campinas, Brasil: Universidade Estadual de Campinas, 2004.

TYAGI, N.; SURESH, S. Production of cellulose from sugarcane molasses using *Gluconacetobacter intermedium* SNT-1: optimization & characterization. **Journal of Cleaner Production**, v. 112, p. 71–80, 20 jan. 2016.

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAS

VEANA, F. et al. Utilization of molasses and sugar cane bagasse for production of fungal invertase in solid-state fermentation using *Aspergillus niger* GH1. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 373–377, jun. 2014.

VIDRA, A.; TÓTH, A. J.; NÉMETH, Á. Lactic acid production from cane molasses. **Waste Treatment and Recovery**, v. 2, n. 1, p. 13–16, 20 dez. 2017.

XIONG, C.; JINHUA, W.; DONGSHENG, L. Optimization of solid-state medium for the production of inulinase by *Kluyveromyces* S120 using response surface methodology. **Biochemical Engineering Journal**, v. 34, n. 2, p. 179–184, 1 maio 2007.