

**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CÂMPUS TOLEDO**

Sergio Luis Yupanqui Mendoza

**Estudo da Produção de Inulinase por Fermentação em Estado
Sólido utilizando como substrato o Resíduo Úmido Cervejeiro e o
Melaço de cana-de-açúcar**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSOS QUÍMICOS E
BIOTECNOLÓGICOS
PPGQB**

**Toledo
2021**

Sergio Luis Yupanqui Mendoza

Estudo da Produção de Inulinase por Fermentação em Estado Sólido utilizando como substrato o Resíduo Úmido Cervejeiro e o Melão de cana-de-açúcar

Study of inulinase production by solid-state fermentation using wet brewing residue and sugarcane molasses as substrates

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Processos Químicos e Biotecnológicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Gracinda Marina Castelo da Silva.

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Priscila Vaz de Arruda

Toledo

2021



Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, mesmo para fins comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Toledo



SERGIO LUIS YUPANQUI MENDOZA

ESTUDO DA PRODUÇÃO DE INULINASE POR FERMENTAÇÃO EM ESTADO SÓLIDO UTILIZANDO COMO SUBSTRATO O RESÍDUO ÚMIDO CERVEJEIRO E O MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Processos Químicos E Biotecnológicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Processos Químicos E Biotecnológicos.

Data de aprovação: 29 de Abril de 2021

Prof.a Gracinda Marina Castelo Da Silva, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Prof Salah Din Mahmud Hasan, Doutorado - Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste)

Prof.a Tatiana Shioji Tiunan, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 29/04/2021.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus por me conceder a vida e a oportunidade de fazer estudos de mestrado em um país estrangeiro, por me dar a saúde, a motivação, a inteligência e a força que precisei durante todo o processo.

Aos meus queridos pais, que me formaram como pessoa, darem-me força, e apesar da distância, sempre os senti perto, oferecendo-me o seu apoio sempre que precisei.

Às minhas orientadoras, professora Dra. Gracinda Silva e Dra. Priscila Vaz, só posso escrever maravilhas sobre elas, excelentes como pessoas e como profissionais. Obrigado por seu apoio, paciência e compreensão. Obrigado pelo aprendizado e conselhos que vocês me deram, esta dissertação não seria possível sem a sua ajuda.

Ao Professor Dr. Clayton Antunes Martins, por me ajudar no meu processo de adaptação na universidade. Por todos os ensinamentos e por sempre estar disponível para me ajudar, muito obrigado.

Aos meus professores, amigos do programa de pós-graduação e amigos do laboratório, a todos eles, muito obrigado pelo aprendizado, pela amizade e pelas coisas que compartilhamos.

À banca avaliadora, por dispor tempo para avaliar o trabalho e pelas valiosas sugestões.

Aos meus queridos amigos, Tiago, Pedro, Wagner, Renan e o Adriano, sinto-me privilegiado por ter pessoas como vocês ao meu lado, sempre me apoiaram, me ajudaram a melhorar o idioma, foram o principal apoio que tive, em qualquer circunstância estavam comigo, obrigado por tudo meus irmãos.

Finalmente, à Organização dos Estados Americanos (OEA), ao Grupo Coimbra de Universidades Brasileiras (GCUB), a UTFPR, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, por terem me escolhido como um dos beneficiários da bolsa de estudo do edital OEA-GCUB nº 001/2018 e fornecer os recursos necessários para a realização deste projeto.

RESUMO

O Resíduo úmido cervejeiro (RUC) e o melaço de cana-de-açúcar, são subprodutos das indústrias cervejeira e açucareira, respectivamente, os quais apresentam potencial aplicação em processos biotecnológicos, tornando-os interessantes alternativas para seu uso como substratos em fermentações, visando produzir compostos de interesse industrial como a síntese de enzimas. Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo a produção de inulinasas de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 utilizando fermentação em estado sólido sob condições otimizadas. Inicialmente foi realizada a caracterização química do RUC e do melaço de cana, seguida da avaliação de três condições de pré-tratamento para o melaço de cana (carvão ativado, EDTA e ácido sulfúrico) afim de remover compostos minerais que são inibidores da produção de enzimas. A segunda etapa consistiu em uma avaliação prévia em fermentação em estado sólido das variáveis de concentração do melaço, tempo de incubação e umidade sobre a atividade inulinase. Para os estudos de otimização foram utilizados um planejamento Plackett-Burman (PB) e o Delineamento Composto Central Rotacional. A partir dos resultados otimizados de atividade inulinase foi realizado uma avaliação cinética da produção enzimática nas condições ótimas e o cálculo da produtividade, seguido de uma caracterização parcial da enzima produzida. Os resultados da caracterização para o RUC e o melaço de cana, mostraram que ambos os substratos apresentam uma importante fonte de proteínas e carboidratos, respectivamente. O uso de um tratamento com ácido sulfúrico para o melaço de cana, foi definido como o mais adequado para favorecer o aumento da atividade enzimática. As análises preliminares da fermentação em estado sólido determinaram que a maior atividade enzimática foi obtida em 72 h e umidade do meio em 75%. A avaliação das variáveis significativas por meio do planejamento PB determinou que apenas três variáveis (temperatura de incubação, concentração de melaço de cana e extrato de levedura) apresentaram significância estatística positiva. Por meio da análise de otimização, foi possível obter um máximo de atividade inulinase em 239,38 U/g e produtividade de 3,69 U/g.h, utilizando os valores otimizados para temperatura de incubação em 37,5 °C, concentração de melaço de cana de 47,1% p/p e 0,16 g de extrato de levedura para cada 5 g de resíduo cervejeiro. Finalmente, quanto à caracterização, a enzima apresentou boa estabilidade entre 50 e 55 °C e ampla faixa de pH entre 4,0 e 6,0, mantendo mais de 80% de sua atividade até as 22h de incubação. As constantes cinéticas correspondentes ao K_m aparente e V_{max} foram 13,6 mM e 3,69 g/L.min, respectivamente. De acordo com os dados obtidos, verifica-se que a enzima obtida na experimentação apresentou alta atividade enzimática, boa produtividade e estabilidade em diferentes condições de pH e temperatura. Desta forma, o estudo demonstra a importância da utilização de resíduos agroindustriais como o RUC e o melaço de cana-de-açúcar, para serem considerados substratos candidatos na formulação de meios de cultura em estado sólido para a síntese de enzimas de interesse industrial.

Palavras-chave: Fermentação em estado sólido. Inulinase. Otimização. *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907. Delineamento Composto Central Rotacional. Delineamento Plackett-Burman.

ABSTRACT

The wet brewing residue (WBR) and sugarcane molasses are by-products of the beer and sugar industries, respectively, which have potential application in biotechnological processes, making them interesting alternatives for their use as substrates in fermentations, aiming produce compounds of industrial interest such as the synthesis of enzymes. In this context, this work aimed to produce *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 inulinases using solid-state fermentation under optimized conditions. Initially, the chemical characterization of WBR and cane molasses was carried out, followed by the evaluation of three pre-treatment conditions for cane molasses (activated carbon, EDTA and sulfuric acid) in order to remove mineral compounds that are inhibitors of enzyme production. . The second stage consisted of a previous evaluation in solid- state fermentation of the molasses concentration, incubation time and humidity variables on the inulinase activity. For the optimization studies, a Plackett-Burman (PB) planning and the Central Rotational Composite Design were used. From the optimized results of inulinase activity, a kinetic evaluation of enzymatic production was performed under optimal conditions and the calculation of productivity, followed by a partial characterization of the enzyme produced. The results of the characterization for WBR and cane molasses, showed that both substrates present an important source of proteins and carbohydrates, respectively. The use of a sulfuric acid treatment for sugarcane molasses was defined as the most appropriate to favor increased enzyme activity. Preliminary analyzes of solid-state fermentation determined that the highest enzyme activity was obtained in 72 h and moisture in the medium in 75%. The evaluation of significant variables through PB planning determined that only three variables (temperature of incubation, concentration of cane molasses and yeast extract) showed positive statistical significance. Through the optimization analysis, it was possible to obtain a maximum inulinase activity at 239,38 U/g and productivity of 3,69 U/g.h, using the values optimized for incubation temperature at 37,5 °C, molasses concentration of 47,1% w/w and 0,16 g of yeast extract for every 5 g of brewing residue. Finally, regarding the characterization, the enzyme showed good stability between 50 and 55 °C and a wide pH range between 4,0 and 6,0, maintaining more than 80% of its activity until 22h of incubation. The kinetic constants corresponding to the apparent K_m and V_{max} were 13,6 mM and 3,69 g/L.min, respectively. According to the data obtained, it appears that the enzyme obtained in the experiment showed high enzymatic activity, good productivity and stability under different pH and temperature conditions. In this way, the study demonstrates the importance of using agro-industrial residues such as RUC and sugarcane molasses, to be considered candidate substrates in the formulation of solid culture media for the synthesis of enzymes of industrial interest.

Keywords: Solid-State Fermentation. Inulinase. Optimization. *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907. Rotatable Central Composite Design. Plackett-Burman Design.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Diagrama do processo de obtenção do RUC.....	20
Figura 2 – Diagrama de fluxo do processo de processamento de açúcar	23
Figura 3 – Estrutura da inulina contendo uma unidade glucopirano terminal (GFn), inulina com uma unidade de frutose (GFm) e uma inulina ramificada (GF5)	26
Figura 4 – A estrutura cristalina da exo-inulinase INU1 de <i>Kluyveromyces marxianus</i> DMKU3-1042.....	27
Figura 5 – Mecanismo de ação de inulinasas	28
Figura 6 – Melaço de cana-de-açúcar utilizado na fase experimental.....	38
Figura 7 – Resíduo cervejeiro após secagem.....	40
Figura 8 – Acompanhamento da concentração de biomassa em função de tempo de fermentação utilizando meios de cultura com tratamento com carvão ativado.....	63
Figura 9 – Acompanhamento da concentração de biomassa em função de tempo de fermentação utilizando meios de cultura com tratamento com diferentes concentrações de EDTA.	65
Figura 10 – Acompanhamento da concentração de biomassa em função de tempo de fermentação utilizando meios de cultura com tratamento com ácido sulfúrico	67
Figura 11 – Gráfica comparativa do acompanhamento da concentração de biomassa em função de tempo de fermentação utilizando os diferentes pré-tratamentos.....	69
Figura 12 – Efeito da concentração de melaço de cana-de-açúcar pré-tratado na produção de inulinase por <i>K. marxianus</i> ATCC 36907 por fermentação em estado sólido	70
Figura 13 – Efeito do tempo de fermentação na produção de inulinase por <i>K. marxianus</i> ATCC 36907 por fermentação em estado sólido.....	71
Figura 14 – Efeito do teor de umidade inicial do meio de cultura sólido na produção de inulinase por <i>K. marxianus</i> ATCC 36907 por fermentação em estado sólido	72
Figura 15 – Gráfica de Pareto para efeito padronizados na atividade inulinase da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 36907 com Planejamento Plackett-Burman	75
Figura 16 – Gráfico dos resíduos vs valores preditos da atividade Inulinase do DCCR para a levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 36907 ($\alpha = 0,05$)	80
Figura 17 – Gráfico da probabilidade normal dos resíduos da atividade Inulinase do DCCR para a levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 36907 ($\alpha = 0,05$).....	81
Figura 18 – Superfícies de resposta do DCCR para a atividade inulinase pela levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 36907 em função de: (A) Melaço de cana e temperatura de incubação, (B) extrato de levedura e temperatura de incubação, (C) Melaço de cana e de extrato de levedura.....	82
Figura 19 – Curvas de contorno do DCCR para a atividade inulinase pela levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 36907 em função de: (A) Melaço de cana e temperatura de	

incubação, (B) extrato de levedura e temperatura de incubação, (C) Melaço de cana e de extrato de levedura.....	83
Figura 20 – Cinética da FES da levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 36907. Perfis de Atividade enzimática Inulinase (U/g) e Açúcares Redutores Totais (ART)	87
Figura 21 – Superfície de resposta do DCCR para a atividade inulinase pela levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 36907 em função do pH e Temperatura	92
Figura 22 – Curvas de contorno para a atividade inulinase pela levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 36907 em função do pH e a Temperatura.	93
Figura 23 – Gráficos de regressão e ajuste linear das atividades enzimáticas em função do tempo para o cálculo das constantes de inativação térmica em diferentes temperaturas. (A) 50 °C; (B) 52 °C; (C) 54 °C; (D) 56 °C; (E) 58 °C e (F) 60 °C	94
Figura 24 – Gráfico de Arrhenius e ajuste linear das constantes de inativação térmica em função da temperatura.	95
Figura 25 – Influência do pH na estabilidade enzimática. Faixa de pH estudada entre 4,0 a 7,5. Os resultados são expressos em termos de atividade residual da enzima inulinase	96
Figura 26 – Gráfica da Velocidade de reação enzimática em função da concentração de sacarose (Temperatura em 55 °C).	98
Figura 27 – Gráfico de Lineweaver-Burk dos parâmetros linearizados de velocidade de reação e concentração de substrato para o cálculo das constantes cinéticas K_m e V_{max}	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização química de dois tipos de melaço de origem diferente.....	25
Tabela 2 – Produção de inulinase a partir de materiais vegetais ricos em inulina, em fermentação submersa	31
Tabela 3 – Microrganismos utilizados para a produção de Inulinase em Fermentação em Estado Sólido (FES).	35
Tabela 4 – Etapas que foram desenvolvidas na Metodologia	37
Tabela 5 – Meio de cultura para obtenção do inóculo.....	39
Tabela 6 – Composição do meio de fermentação para o tratamento.....	47
Tabela 7 – Planejamento experimental de Plackett-Burman para variáveis físicas e nutricionais na produção de inulinase por <i>K. marxianus</i> ATCC 36907 em FES.....	50
Tabela 8 – Faixa de valores dos fatores avaliados para a otimização da produção de inulinase utilizando o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).....	52
Tabela 9 – Valores utilizados no DCCR 2 ² para determinação de pH e temperatura ótima da enzima inulinase.	53
Tabela 10 – Composição química do Resíduo úmido cervejeiro (RUC)	58
Tabela 11 – Composição química do Melaço de cana-de-açúcar	60
Tabela 12 – Resultados das atividades enzimáticas dos diferentes tratamentos com carvão ativado para o melaço de cana-de-açúcar por fermentação submersa.....	62
Tabela 13 – Resultados das atividades enzimáticas dos diferentes tratamentos com EDTA para o melaço de cana-de-açúcar por fermentação submersa.....	64
Tabela 14 – Resultados das atividades enzimáticas dos diferentes pré-tratamentos com ácido sulfúrico para o melaço de cana-de-açúcar por fermentação submersa.	66
Tabela 15 – Resultados comparativos dos melhores tratamentos aplicados ao melaço de cana-de-açúcar em função da atividade inulinase por fermentação submersa.....	68
Tabela 16 – Planejamento Plackett-Burman (12 ensaios) para seleção de variáveis físicas e nutrientes do meio de cultivo com a atividade inulinase como variável resposta.....	74
Tabela 17 – Matriz do Planejamento experimental 2 ³ para otimização da produção de inulinase pela levedura <i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 36907 por FES utilizando o DCCR	77
Tabela 18 – Coeficientes de regressão e significância do modelo de regressão para a resposta da atividade da inulinase.....	78
Tabela 19 – ANOVA do DCCR para o modelo de segunda ordem da atividade inulinase	79
Tabela 20 – Comparação de ensaio não otimizado e otimizado pelo DCCR.....	86
Tabela 21 – Comparação dos resultados obtidos de atividade enzimática e produtividade com enzimas inulinases produzidas por FES	89

Tabela 22 – Matriz do DCCR 2 ² na determinação da temperatura e o pH ótimo de reação em função da atividade inulinase.	90
Tabela 23 – Análise de variância (ANOVA) do DCCR na determinação da temperatura e o pH ótimo de reação em função da atividade inulinase	91
Tabela 24 – Resumo dos parâmetros de inativação térmica para inulinase produzida por <i>K. marxianus</i> ATCC 36907 por FES	95
Tabela 25 – Atividade inulinase em função da concentração de sacarose	97
Tabela 26 – ANOVA unilateral para tratamentos com carvão ativado em melaço de cana-de-açúcar em função da atividade inulinase em fermentação submersa	113
Tabela 27 – Matriz de Tukey das diferenças de médias entre os grupos dos tratamentos com carvão ativado avaliados em função da atividade inulinase.	113
Tabela 28 – ANOVA unilateral para tratamentos com EDTA em melaço de cana-de-açúcar em função da atividade inulinase em fermentação submersa.	114
Tabela 29 – Matriz de Tukey das diferenças de médias entre os grupos dos tratamentos com EDTA avaliados em função da atividade inulinase.	114
Tabela 30 – ANOVA unilateral para tratamentos com ácido sulfúrico em melaço de cana-de-açúcar em função da atividade da inulinase em fermentação submersa.	115
Tabela 31 – Matriz de Tukey das diferenças de médias entre os grupos dos tratamentos ácidos avaliados em função da atividade inulinase.	115

LISTA DE ABREVIACOES

RUC	Resíduo mido Cervejeiro
FES	Fermentaco em Estado Sólido
EDTA	cido etilenodiaminotetracético
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
INAB	Indústria Nacional de Bebidas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
FOS	Fruto-oligossacarídeos
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
PB	Plackett-Burman
ART	Açúcares redutores totais
gss	Gramas de substrato seco
UTFPR	Universidade Tecnológica Federal do Paraná

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	OBJETIVOS.....	17
	2.1 Objetivo geral	17
	2.2 Objetivos Específicos.....	17
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
	3.1 Indústria Cervejeira e seu processo de produção.....	18
	3.2 Resíduo Úmido Cervejeiro (RUC)	21
	3.3 Indústria açucareira e processo de produção de açúcar.....	22
	3.4 Melão de cana-de-açúcar	24
	3.5 Inulina.....	25
	3.6 Inulinases.....	27
	3.7 Fermentação em Estado Sólido (FES).....	29
	3.8 Microrganismos produtores de inulinase em FES	30
	3.9 <i>Kluyveromyces marxianus</i>	32
	3.10 Substratos utilizados para a produção de inulinase em FES	34
4	METODOLOGIA	37
	4.1 Substratos.....	38
	4.2 Microrganismo.....	38
	4.3 Caracterização da matéria-prima.....	39
	4.3.1 Caracterização Físico-Química do RUC.....	39
	4.3.2 Caracterização Físico-Química do melão de cana-de-açúcar.....	44
	4.4 Ensaio de Pré-tratamento	46
	4.4.1 Tratamento com carvão ativado	47
	4.4.2 Tratamento com Ácido Sulfúrico.....	47
	4.4.3 Tratamento com EDTA.....	48
	4.5 Ensaio de Fermentação em Estado Sólido.....	48

4.5.1	Efeito da concentração de melaço de cana-de-açúcar	49
4.5.2	Efeito do tempo de fermentação	49
4.5.3	Efeito do teor inicial de umidade	49
4.6	Efeito das condições de cultivo para a produção de inulinase	50
4.7	Otimização das condições físicas e nutricionais na produção de Inulinase utilizando Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)	51
4.8	Extração da enzima inulinase produzida por <i>K. marxianus</i> ATCC 36907	52
4.9	Caracterização parcial da enzima inulinase	52
4.9.1	Determinação do pH ótimo e temperatura ótima	52
4.9.2	Temperatura de Estabilidade	53
4.9.3	pH de estabilidade	54
4.9.4	Determinação das constantes cinéticas	55
4.10	Métodos Analíticos	55
4.10.1	Determinação da concentração de glicose, xilose, arabinose.....	55
4.10.2	Determinação do pH	56
4.10.3	Determinação de açúcares redutores	56
4.10.4	Determinação de biomassa seca	56
4.10.5	Determinação da atividade enzimática do extrato.....	57
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	58
5.1	Caracterização da matéria-prima.....	58
5.1.1	Caracterização do Resíduo Úmido Cervejeiro (RUC)	58
5.1.2	Caracterização do melaço de cana-de-açúcar.....	60
5.2	Pré-tratamento do melaço de cana-de-açúcar	61
5.2.1	Tratamento com carvão ativado	61
5.2.2	Tratamento com EDTA.....	64
5.2.3	Tratamento ácido.....	66
5.2.4	Análise comparativo dos diferentes tratamentos ao melaço de cana-de-açúcar	68

5.3	Ensaio de Fermentação em Estado Sólido (FES)	70
5.3.1	Efeito da concentração de melaço pré-tratado na atividade inulinase	70
5.3.2	Efeito do tempo na atividade inulinase	71
5.3.3	Efeito do teor de umidade inicial na produção de inulinase	72
5.4	Efeito das condições de cultivo para a produção de inulinase	73
5.5	Otimização da produção de inulinase por DCCR	76
5.6	Validação do modelo otimizado	85
5.7	Cinética da Produção enzimática na condição ótima	87
5.8	Caracterização parcial da enzima inulinase	89
5.8.1	Determinação do pH ótimo e temperatura ótima	89
5.8.2	Temperatura de Estabilidade.....	93
5.8.3	pH de Estabilidade	96
5.8.4	Determinação das constantes de Michaelis-Menten (K_m e V_{max})	97
6	CONCLUSÕES	99
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	100
	REFERÊNCIAS	101
	APÊNDICE A – ANOVA E TESTE DE TUKEY (TRATAMENTOS COM CARVÃO ATIVADO)	113
	APÊNDICE B – ANOVA E TESTE DE TUKEY (TRATAMENTOS COM EDTA)	114
	APÊNDICE C – ANOVA E TESTE DE TUKEY (TRATAMENTOS ÁCIDOS)	115

1 INTRODUÇÃO

A indústria alimentícia nas últimas duas décadas experimentou um intenso processo de desenvolvimento, aplicando diversas tecnologias de processamento de matérias-primas agroindustriais na obtenção de produtos de interesse. Nesse contexto, como resultado das principais atividades que envolvem o setor de alimentos, são gerados uma grande gama de subprodutos e resíduos agroindustriais que representam quantidades significativas e sem o devido tratamento podem ocasionar problemas ambientais.

Numerosas tecnologias para o reaproveitamento desses resíduos incluem aplicações sustentáveis, como a produção de fertilizantes orgânicos e aditivos na alimentação animal, porém, devido às suas altas perspectivas nutricionais, têm recebido maior consideração para seu uso na produção de compostos sintetizados via processos biotecnológicos.

As técnicas de biotecnologia aplicadas ao aproveitamento dos nutrientes presentes nos resíduos agroindustriais têm sido responsáveis por reescrever o que é geralmente conhecido como “desperdício”, para ser considerado matéria-prima para o desenvolvimento de diversos microrganismos (SADH; DUHAN; DUHAN, 2018), uso de tais matérias-primas, por sua vez, permitiria a produção de vários compostos de importância industrial como ácidos orgânicos, biosurfactantes, bioetanol e diversas enzimas através de processos de fermentação.

Nesse sentido, o resíduo úmido cervejeiro (RUC), principal subproduto da fabricação da cerveja, assim como o melaço de cana-de-açúcar, líquido viscoso escuro obtido durante a produção de açúcar (VEANA et al., 2014), apresentam diversas vantagens para serem considerados candidatos promissores para seu uso em fermentações industriais.

O RUC é composto de grão de cevada gasto, trub quente e levedura residual de cerveja. Além de apresentar alta disponibilidade e baixo custo (MUSSATTO et al. 2006), possui alto índice de produção, sendo gerado entre 14 a 20 kg desse material para cada 100 L de cerveja produzida. Considerando apenas os três maiores produtores de cerveja (China, EUA e Brasil), a produção mundial chega a quase 84 bilhões de litros por ano, o que se traduz na geração de aproximadamente 143 milhões de kg de grãos de cevada gastos, 2,5 milhões de kg de trub quente e 19 milhões de kg de levedura residual (MATHIAS et al., 2017). Além disso, como dado principal o RUC possui também um importante teor de matéria orgânica rica em fibras, proteínas, aminoácidos, minerais, vitaminas e compostos fenólicos (GOTTHARDI et al., 2018).

Por outro lado, o melaço da cana-de-açúcar é um dos principais subprodutos da indústria açucareira. De acordo com Shahbandeh (2020), para o período 2019/2020, o Brasil lidera como o maior produtor de açúcar do mundo, produzindo cerca de 30 milhões de toneladas métricas o que gera entre 40 a 60 kg de melaço de cana por tonelada de cana processada. Ao contrário do RUC, o melaço de cana-de-açúcar é composto principalmente por açúcares e minerais, sendo a sacarose presente em maior proporção.

São inúmeros os relatos na literatura baseados no uso individual desses resíduos aplicados em processos de fermentação utilizando microrganismos, com o objetivo de obter compostos de interesse industrial como a síntese de enzimas (KAPOOR; PANWAR; KAIRA, 2016). Atualmente, a indústria de enzimas microbianas representa aproximadamente 90% do mercado de biocatalisadores (TERESITA, 2019). Algumas propriedades como a utilização de microrganismos versáteis para se propagar em grande escala e somadas às necessidades nutricionais simples, têm permitido que a produção de enzimas a partir de microrganismos seja relativamente simples, barata e confiável.

As inulinases são uma importante classe de enzimas hidrolíticas que pertencem à família das glicosídeo-hidrolases e são caracterizadas por sua ação hidrolítica sobre a inulina. Apresentam aplicações, principalmente na produção de soros de frutose, bem como participar de processos de síntese de frutooligossacarídeos (compostos prebióticos que servem como fonte de alimento para as bactérias intestinais que mantêm a boa saúde e o funcionamento do sistema digestivo) e produção de biocombustíveis (OLIVEIRA et al., 2016).

As inulinases podem ser sintetizadas usando fermentações submersas, bem como no estado sólido, utilizando uma ampla gama de microrganismos, como *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Kluyveromyces spp.*, *Candida spp.*, *Arthrobacter spp.*, *Xanthomonas spp.*, *Bacillus spp.*, *Bacillus spp.*, entre as quais as cepas de *Kluyveromyces marxianus* apresentam maiores rendimentos e melhores perfis de atividade enzimática (SINGH; SINGH; PANDEY, 2019).

Com base no exposto até o momento, torna-se clara a necessidade de investir esforço em pesquisa no sentido de desenvolver novas tecnologias de biovalorização de resíduos agroindustriais que representem recursos de baixo custo e alta disponibilidade em território brasileiro. Nesse sentido, a fermentação em estado sólido catalisada por microrganismos se apresenta como uma estratégia capaz de promover caminhos alternativos para os resíduos

gerados, reduzindo possíveis problemas ambientais, bem como agregar valor a essas matérias-primas por meio da produção de substâncias de interesse industrial como as enzimas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Produzir enzimas inulinases por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 em fermentação em estado sólido utilizando como substratos o resíduo úmido cervejeiro e o melaço de cana-de-açúcar.

2.2 Objetivos Específicos

- Fazer a caracterização físico-química do resíduo úmido cervejeiro e do melaço de cana-de-açúcar.
- Avaliar o efeito do pré-tratamento com ácido, EDTA e carvão ativado para o melaço de cana-de-açúcar sobre a atividade inulinase.
- Avaliar o efeito preliminar do tempo de fermentação, teor de umidade e concentração de melaço de cana-de-açúcar em meio sólido para produção de inulinase.
- Determinar o efeito dos componentes do meio de cultura e as condições de cultivo na produção de inulinase utilizando o planejamento Plackett-Burman.
- Otimizar as melhores condições de fermentação em estado sólido para produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907.
- Avaliar a cinética da FES com os dados otimizados.
- Caracterizar parcialmente a enzima inulinase produzida por fermentação sólida por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Indústria Cervejeira e seu processo de produção

A indústria da cerveja movimenta uma imensa rede que envolve desde a pesquisa, o cultivo, o processamento e a comercialização de insumos e matérias-primas até a entrega do produto ao consumidor (CERV BRASIL, 2017). O Brasil é o terceiro maior produtor de cervejas do mundo com uma produção de cerca de 14,1 bilhões de litros ao ano, com presença percentual na produção de cerveja de 12,3%, no sul do Brasil (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul).

De acordo com aspectos globais da produção de cerveja e de resíduos sólidos gerados, a produção de cerveja aumentou nos últimos anos, especialmente em China, Estados Unidos e Brasil, de 1,3 bilhão de hectolitros (130 bilhões de litros) em 1998 para 1,95 bilhão de hectolitros (195 bilhões de litros) em 2017, segundo portal web The Statistics Portal (2018).

Para detalhar o processo de produção da cerveja, o processamento de sua matéria-prima deve ser enfatizado. A Cevada (*Hordeum vulgare*) é uma planta monocotiledônea pertencente à família das Poaceae (gramíneas); por sua vez, é um cereal de grande importância para o consumo. A cevada em termos gerais, é o cereal mais importante do mundo depois do trigo, milho e arroz, e é usada principalmente como ração animal ou como matéria-prima para produzir cerveja (KENDALL, 1994). O grão de cevada é rico em amido e proteínas e consiste em três partes principais: o germe (embrião), o endosperma (que compreende a aleurona e o endosperma com amido) e os revestimentos de grãos (MUSSATTO et al. 2006).

Na preparação para a fabricação de cerveja, a cevada colhida é limpa e classificada de acordo com seu tamanho. Após um período de latência de 4 a 6 semanas, a cevada é maltada em um processo de germinação controlada, que serve para aumentar o conteúdo enzimático do grão. O processo de maltagem é feito em três etapas: (1) imersão, (2) germinação e (3) secagem (MUSSATTO et al. 2006).

Durante a maceração, os grãos limpos de cevada são colocados em tanques com água (temperatura entre 5 e 18°C) onde são mantidos por um período de aproximadamente dois dias, sendo realizadas sucessivas trocas de água a cada 6 a 8 horas. Após 2 dias a cevada atinge um teor de umidade de 42 a 48%. Nesta etapa, o metabolismo da semente é ativado através da hidratação, induzindo a germinação. Em seguida, a cevada macerada é colocada para germinar

em compartimentos apropriados que permitem a passagem de um fluxo de ar úmido através do leito de cevada, mantendo a temperatura dos grãos na faixa de 15 a 21°C.

Nesta segunda etapa ocorrem mudanças físico-químicas e estruturais do grão, sendo formadas e ativadas as principais enzimas do malte (amilases, proteases, glucanases, entre outras). Ao término da germinação (processo que dura de 6 a 7 dias), o malte de cevada obtido é secado em uma temperatura de 40 a 60°C até obter um teor de umidade de 4 a 5%, para evitar a contaminação microbiana e desenvolver o sabor característico do malte. Em seguida o malte desidratado é armazenado em silos durante 3 a 4 semanas para homogeneizar seu teor de umidade (KENDALL, 1994; VENTURINI FILHO; CEREDA, 2001).

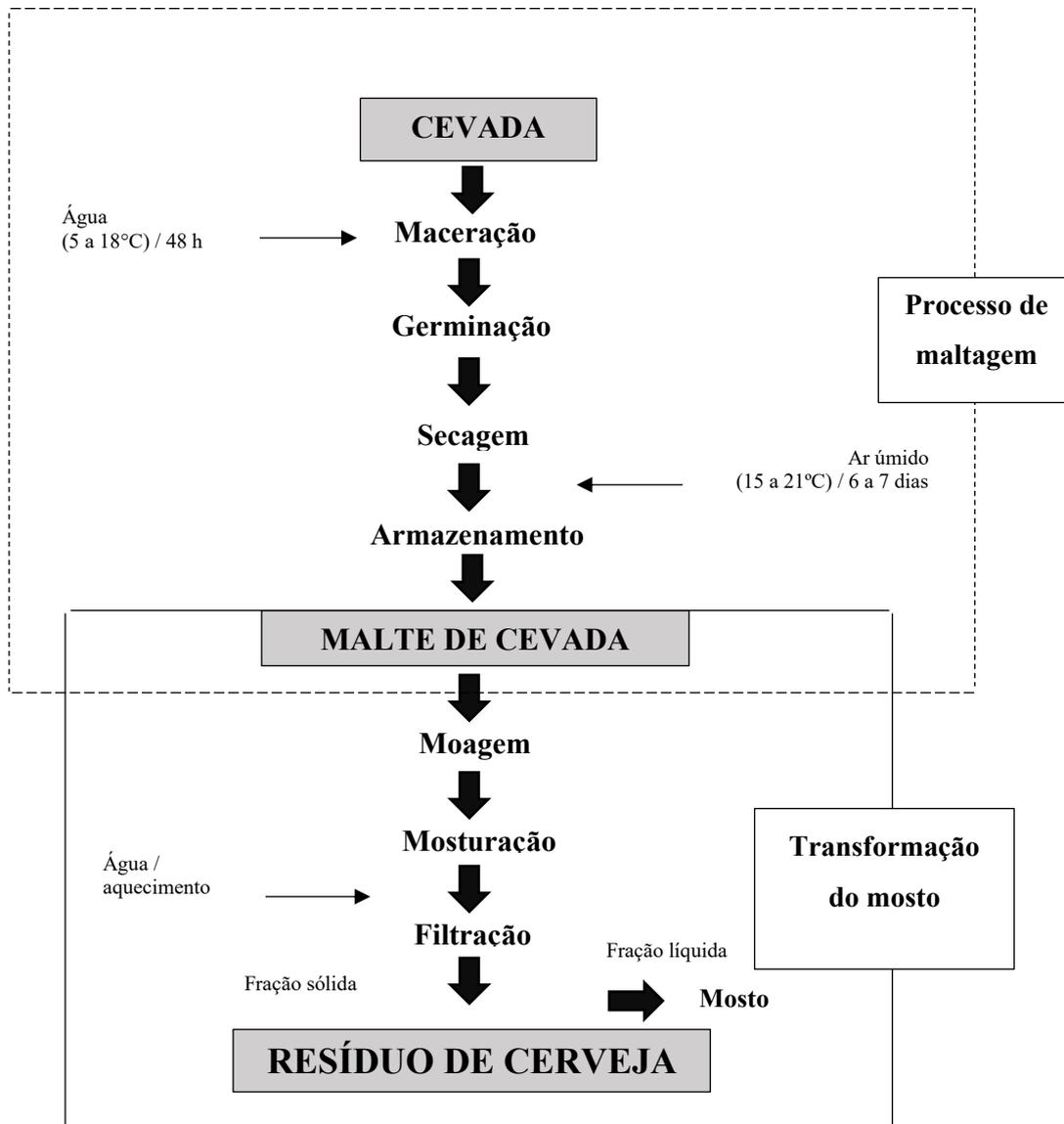
Nas cervejarias, o malte de cevada é moído e em seguida submetido a um processo de mosturação, onde os grãos moídos da cevada malteada são misturados com água e a mistura obtida é aquecida em vários níveis de temperatura (aumentados lentamente de 37 a 78°C). Este processo tem como objetivo promover a hidrólise enzimática dos constituintes do malte, principalmente do amido, que é convertido em açúcares fermentáveis (maltose e maltotriose) e não-fermentáveis (dextrinas).

Posteriormente, é realizada uma filtração para separar a fração líquida, denominada mosto, a qual é empregada como meio de fermentação para a produção da cerveja. A fração sólida obtida é composta pelo bagaço do malte de cevada (LINKO et al. 1998; DRAGONE, 2007). Após o processo de maltagem, o mosto é submetido a fermentação, prévia adição de lúpulo em conjunto com o microrganismo, este último será responsável de realizar o processo de transformação de açúcares em álcool. Na Figura 1, apresenta-se uma representação esquemática geral do processo de obtenção do mosto para o processo de fermentação, detalhando também a produção de resíduo úmido cervejeiro (RUC)¹, que por sua vez é composto principalmente por bagaço de malte e componentes residuais de lúpulo² e levedura excedente do processo.

¹ O resíduo úmido cervejeiro tem um teor de matéria seca de 20-25%. Não há diferenças significativas na composição química correlacionada com o teor de matéria seca, embora isso seja variável. Disponível em: www.lpernia.com Acesso em: 23 de jun. de 2019.

² O teor de lúpulo gasto no material seco obtido a partir do resíduo de cerveja não excede os 3%. Disponível em: www.engormix.com. Acesso em: 23 de jun. de 2019.

Figura 1 – Diagrama do processo de obtenção do RUC



Fonte: Adaptado de Musatto (2006).

Segundo Townsley (1979), o processo cervejeiro é seletivo e remove a partir da cevada malteada somente os nutrientes que são necessários para a fabricação do mosto. O RUC pode ser proveniente somente da matéria-prima empregada (malte de cevada), ou da matéria-prima e de adjuntos (arroz ou milho) que podem ser incorporados ao processo durante a mosturação.

3.2 Resíduo Úmido Cervejeiro (RUC)

Durante o processo de fabricação de cerveja, muitos tipos de resíduos são gerados, como grãos usados no processo de maltagem, gordura residual e levedura residual da fabricação. Esses resíduos são responsáveis pela perda de aproximadamente 20 em cada 100 L de água utilizada no processo de fermentação, principalmente pelo alto teor de umidade, entre 80 e 90%, proporcionando grandes perdas de mosto e cerveja (STEWART; PRIEST, 2006).

O resíduo úmido cervejeiro, também conhecido como bagaço cervejeiro, polpa úmida de cervejaria ou bagaço de cevada, está constituído principalmente pelas cascas da cevada malteada (bagaço de malte), e é o principal subproduto da indústria cervejeira, e se encontra disponível em grandes quantidades e a um baixo custo (MUSSATTO et al. 2006). Segundo Santos e Ribeiro (2005), o RUC é quantitativamente o principal subproduto do processo cervejeiro, sendo gerado de 14-20 kg a cada 100 litros de cerveja produzida. Da mesma forma, a grande produção anual de cerveja no Brasil, terceiro maior produtor mundial de cerveja com uma média 13,3 bilhões de litros de cerveja gerados por ano³, dá ideia da enorme quantidade de subproduto gerado.

O bagaço cervejeiro principal componente do RUC, consiste principalmente de casca, pericarpo e semente da cevada. Dependendo da uniformidade da maltagem, os restos de amido no endosperma e remanescentes da parede celular podem permanecer em maior ou menor quantidade. Mesmo assim, o teor de amido é insignificante em comparação com os compostos da parede celular dos revestimentos de casca, pericarpo e semente, que são abundantes em polissacarídeos de celulose e não celulose, lignina, algumas proteínas e lipídios. A casca, por sua vez, possui altos teores de silício e polifenóis (MUSSATTO et al. 2006).

Segundo a FEDNA (2019), o resíduo úmido cervejeiro é um subproduto rico em proteínas, com teor de 24 a 26% em matéria seca, 8% são lipídios, 53% em FDN (fibra em detergente neutro), 27% de FDA (fibra em detergente ácido), cinzas (2,5 a 4,5%), vitaminas, aminoácidos e compostos fenólicos.

Segundo Santos et al. (2003), a composição química do bagaço cervejeiro varia de acordo com as variedades de cevada utilizadas, as condições de colheita, malte e maceração

³ Informações disponíveis em: <https://www.sindicerv.com.br/o-setor-em-numeros/> Acesso em: 20 de ago. de 2020.

dos processos, bem como a qualidade e quantidade dos adjuntos adicionados no momento do processamento.

No âmbito de uma valorização adequada deste tipo de resíduo e somado à sua importância nutricional, o RUC tem um vasto leque de destinos possíveis, entre os quais se destacam: Suplementação animal, produção de energia por combustão direta, produção de biogás por fermentação anaeróbica, a produção de carvão vegetal, a sua utilização como material adsorvente para tratamentos químicos, utilizado como meio de cultivo de microrganismos para obtenção de bioprodutos por fermentação (TUSET, 2020).

Neste sentido, as características bioquímicas do RUC devem permitir o desenvolvimento e a atividade microbiana de um sistema de fermentação. O processo microbiológico requer não apenas fontes de carbono e nitrogênio, mas também uma faixa de pH neutro para que o processo se desenvolva satisfatoriamente. Desta maneira, a composição de inulina presente na cevada, é de 1,5% e 4%, no entanto sua composição de inulina no resíduo de cerveja não é definida na bibliografia (MEYER; BLAAUWHOED, 2009).

3.3 Indústria açucareira e processo de produção de açúcar

Em todo o mundo, a produção anual de cana-de-açúcar é de aproximadamente 1 800 milhões de toneladas e cobre uma área de 24 milhões de hectares. Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, tendo uma produção estimada de 615,97 milhões de toneladas por ano (dados da safra de 2019/20), distribuídas em 371 unidades de produção por ano, gerando assim mais de 40% da produção mundial⁴.

A indústria de cana-de-açúcar poder ser destinada à produção do álcool a partir do caldo (usinas autônomas) ou a partir do caldo e melaço (usinas anexas), sendo que a primeira o único produto final será o álcool, enquanto que nas usinas anexas são produzidos álcool e açúcar (OLIVEIRA, 2019).

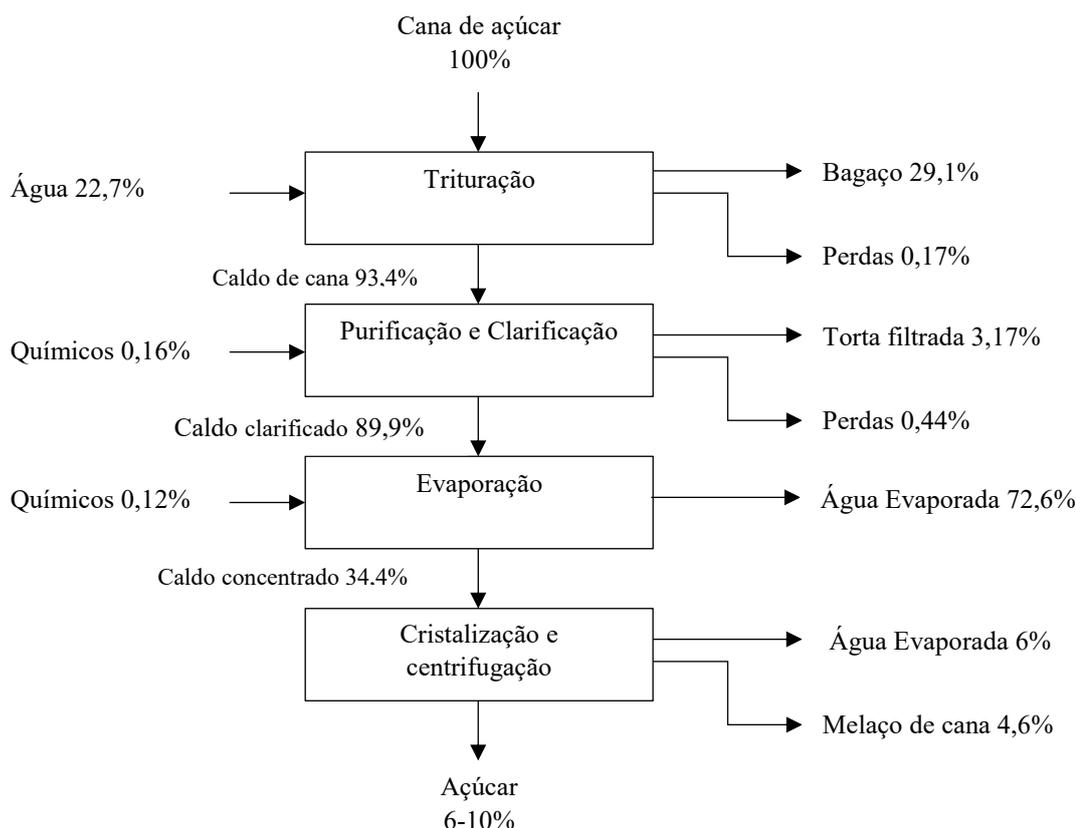
De acordo com o portal Observatório da Cana, da produção total de cana-de-açúcar da safra 2019/2020, foram produzidos 35,5 milhões de toneladas de etanol anidro e hidratado e, 29,6 milhões de toneladas de açúcar, sendo o estado do Paraná o terceiro maior produtor de

⁴ Informações disponíveis em: <https://www.conab.gov.br>. Acesso em: 22 de jun. de 2019.

açúcar com 2 milhões de toneladas, atrás apenas de São Paulo e Minas Gerais, com 18,5 e 3,1 milhões de toneladas respectivamente⁵.

O fluxograma da Figura 2 apresenta as etapas desenvolvidas em uma usina de fabricação do açúcar a partir da cana, é importante levar em consideração que nessas etapas não foi considerada a produção do etanol.

Figura 2 – Diagrama de fluxo do processo de processamento de açúcar



Fonte: Adaptado de Iryani et al., (2012)

A usina típica está composta pelos seguintes processos: recepção da cana, preparo da cana e extração do caldo. O caldo extraído é encaminhado para o sistema de tratamento de caldo, no qual as impurezas são retiradas para fornecer um material adequado para as etapas subsequentes; embora a maioria das operações de tratamento de caldo seja comum tanto para a produção de açúcar quanto para a produção de etanol, cada processo tem suas especificações.

Segundo Iryani et al., (2012), na fabricação do açúcar em linhas gerais, o caldo de cana é concentrado, cristalizado, centrifugado e seco. Depois do processo de acondicionamento da cana (trituração e purificação) para remoção de partículas grandes e posterior clarificação com

⁵ Informações disponíveis em: <https://observatoriodacana.com.br/> Acesso em: 16 de jul. de 2020.

cal, o caldo clarificado, ou chamado de caldo *light*, passa então por trocadores de calor para pré-aquecer antes da evaporação.

A evaporação é realizada em duas etapas: inicialmente em uma estação evaporadora para concentrar o caldo e depois em cubetas a vácuo para cristalizar o açúcar. Após a evaporação, o caldo concentrado vai para cristalização. Os cristais de açúcar são lavados com água e a água de lavagem centrifugada dos cristais; durante esse processo, é produzido o melaço de cana, uma solução residual concentrada de açúcar.

O melaço de cana-de-açúcar ou subproduto da cristalização da produção de açúcar, é geralmente utilizada em processos de fermentação visando aumentar a produção de etanol. O caldo de cana destinado para a produção de etanol é misturado ao melaço, fermentado com levedura (que é recuperada e reutilizada no processo de fermentação), e o produto da fermentação contendo etanol é encaminhado para destilação e desidratação (DIAS et al., 2015).

Toda a energia (vapor e eletricidade) necessária neste processo é produzida pela usina a partir do bagaço da cana-de-açúcar como combustível. Em muitas usinas, a energia excedente é gerada para venda à rede. Algumas usinas vêm recuperando uma fração da palha da cana (pontas e folhas) e usando-a também como combustível, porém ainda não é uma prática comum nas instalações brasileiras devido aos altos custos de recuperação e questões sobre implicações no solo de curto e longo prazo (CARDOSO et al., 2013). Porém, a eliminação da queima da cana-de-açúcar oferece uma oportunidade para o uso da palha.

3.4 Melaço de cana-de-açúcar

O melaço de cana-de-açúcar, é um produto líquido obtido como resíduo da fabricação do açúcar cristalizado, do melado ou da refinação do açúcar bruto (FAGUNDES, 2010). O melaço constitui-se no segundo subproduto principal da indústria do açúcar, antes do bagaço de cana, sendo produzido na proporção de 40 a 60 kg por tonelada de cana processada.

O melaço é relativamente abundante no Brasil e possui na sua composição uma grande variedade de açúcares, sendo considerado um substrato com grande potencial e inúmeras aplicações nas fermentações industriais⁶ (VILLAVICENCIO; SANT'ANNA; TÔRRES, 1999).

⁶ No Brasil, devido ao elevado teor de açúcares totais e demais componentes, o melaço é utilizado, principalmente, na fabricação de álcool etílico, sendo aproveitado, também, em outros processos biotecnológicos como matéria-prima para a produção de proteína, rações, levedura prensada para panificação, antibióticos, entre outros. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/> Acesso em: 21 de jun. de 2019.

A Tabela 1 apresenta a composição média do melaço de cana-de-açúcar segundo Veana et al. (2014).

Tabela 1 – Caracterização química de dois tipos de melaço de origem diferente

Melaço	Total açúcares (%)	Açúcares redutores livres (%)	Nitrogênio (%)	Fósforo (%)
Melaço variedade Mexicana	51,63 ± 1,56	18,15 ± 0,30	0,28 ± 0,05	0,17 ± 0,01
Melaço variedade cubana	50,58 ± 0,86	12,31 ± 1,11	0,43 ± 0,01	0,14 ± 0,02

Fonte: Veana et al. (2014)

Em síntese, sua composição é composta principalmente de água e sacarose (47-50% p/p), da mesma forma, também tem uma importante porcentagem de proteínas, vitaminas, aminoácidos, ácidos orgânicos e metais pesados como ferro, zinco, cobre, manganês, magnésio e cálcio (ROUKAS, 1998).

Embora o potencial nutricional para uso em fermentações de melaço de cana é conhecido, sua grande concentração de metais pesados é a causa de um problema crítico na sua utilização. A presença de metais pesados inibe o crescimento de microrganismos, influencia o pH do substrato e está envolvida na inativação de enzimas associadas a biossíntese de produtos quando é utilizada como substrato por microrganismos (TREICHEL, 2004). Segundo Vidra et al. (2017), são necessários tratamentos prévios de melaço de cana antes de serem utilizados em processos de fermentação. Os métodos que foram aplicados até agora são tratamentos com ácido sulfúrico, fosfato tricálcico, ferrocianeto de potássio e EDTA⁷, para melhorar a eficiência da fermentação causada pela extração destes metais, já seja por precipitação ou adesão a uma matriz e posterior extração⁸.

3.5 Inulina

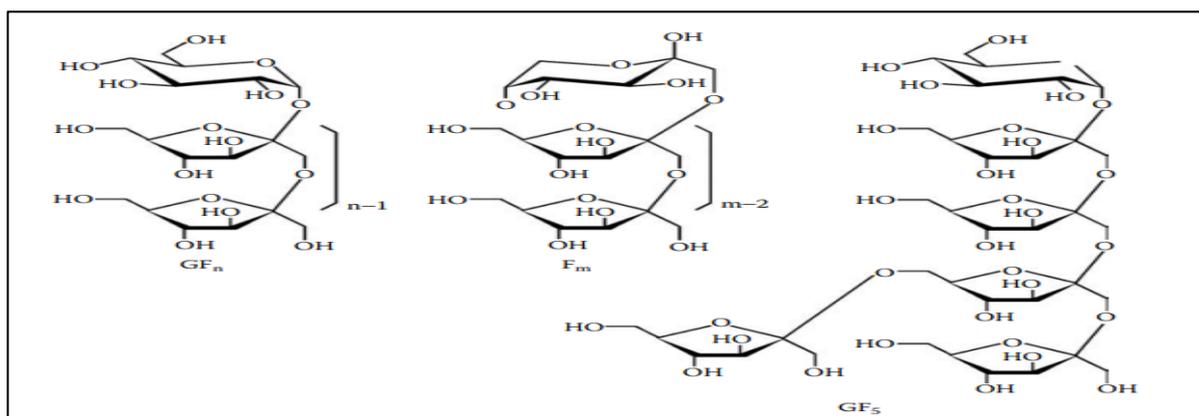
A inulina, é um polissacarídeo natural, pertence a uma classe de fibras alimentares conhecidas como frutanos. Na natureza, é o segundo polissacarídeo de armazenamento mais abundante. Estruturalmente, a inulina [α -D-glucopiranosil- β -D-frutofuranosil- (n-1) -D-

⁷ Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), é um ácido que atua como ligante hexadentado, ou seja, pode complexar o íon metálico através de seis posições de coordenação. Disponível em: <http://www.saberquimica.com.br/> Acesso em: 21 de jun. de 2019.

⁸ Treichel (2004) afirma que, apesar dos métodos convencionais com tratamentos ácidos e tratamentos com EDTA, também podem ser aplicados métodos utilizando terra de diatomácea e carvão ativo, com o objetivo de diminuir a concentração de metais pesados no melaço de cana.

frutofuranosídeo] é composta de oligômero de frutossil ligado a β -D (2 \rightarrow 1) com uma glicose na extremidade redutora. A Figura 3 apresenta a estrutura da inulina, a unidade de glicose está ligada por uma união glicosídica α -D (1 \rightarrow 2) presente na forma de piranose, enquanto a unidade de frutose está na forma de furanose (SINGH et al. 2019).

Figura 3 – Estrutura da inulina contendo uma unidade glucopiranosose terminal (GF_n), inulina com uma unidade de frutose (GF_m) e uma inulina ramificada (GF₅)



Fonte: Kays e Nottingham (2007).

Além de desempenhar funções de armazenamento de energia, a inulina nas plantas desempenha um papel essencial na tolerância ao estresse abiótico, e sua função osmorreguladora pode proteger as plantas das tensões da seca, do sal e do frio (APOLINÁRIO et al. 2014).

A inulina possui muitas propriedades de promoção da saúde, devido às quais é considerada um alimento funcional, seu alto grau de polimerização (DP) atua como um potencial prebiótico em indústrias de processamento de alimentos.

A inulina em combinação com FOS (frutooligossacarídeos) é utilizada como uma fibra dietética não digerível que promove a microbiota intestinal humana ao estimular o crescimento de probióticos⁹ no intestino humano. Além dessa função, também é utilizado no metabolismo lipídico, absorção de íons minerais do intestino, controle do nível de açúcar no sangue e prevenção da obesidade, criptas aberrantes quimicamente induzidas, câncer de cólon, etc (SINGH; SINGH, 2010).

⁹ Os probióticos são microrganismos vivos, administrados em quantidades adequadas, que conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Os probióticos são micróbios vivos que podem ser incluídos na preparação de uma ampla gama de produtos, incluindo alimentos, medicamentos, e suplementos dietéticos (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006).

A maioria das plantas ricas em inulina são relatadas a partir de famílias monocotiledôneas e dicotiledôneas. A inulina está presente em uma quantidade considerável em bolbos, tubérculos e raízes tuberosas de muitas plantas como *Dahlia pinnata* (Dahlia), *Taraxacumofficinale* (Dente de Leão), *Asparagus officinalis* (Shatwaar), *Helianthus tuberosus* (Alcachofra Jerusalém), *Espargos racemosus* (Shatavari), *Cichoriumintybus*. (Chicória), *Hordeum vulgare* (Cevada) (SINGH; SINGH, 2010).

Nesse contexto, os materiais vegetais ricos em inulina e substratos mistos podem ser utilizados como substratos potentes para vários bioprocessos (ONILUDE; FADAUNSI; GARUBA, 2012). As matérias-primas inulinadas têm sido extensivamente utilizadas para a produção de inulinases, inulooligossacarídeos, biocombustíveis, ácidos orgânicos, óleo, proteínas de célula, manitol, sorbitol, 2,3-butanodiol e pululano, sendo utilizado principalmente na síntese de xarope de alta frutose, inulinases, frutooligossacarídeos e biocombustíveis (SINGH et al. 2019).

3.6 Inulinases

As inulinases são uma classe de enzimas que hidrolisam a ligação β -2,1 glicosídica para produzir frutose, inulo-oligossacáridos e glicose. As inulinases são produzidas por fungos, bactérias, leveduras e actinomicetos (NEAGU; BAHRIM, 2011). Na Figura 4 é apresentada a estrutura cristalina da exo-inulinase de *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042.

Figura 4 – A estrutura cristalina da exo-inulinase INU1 de *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042.

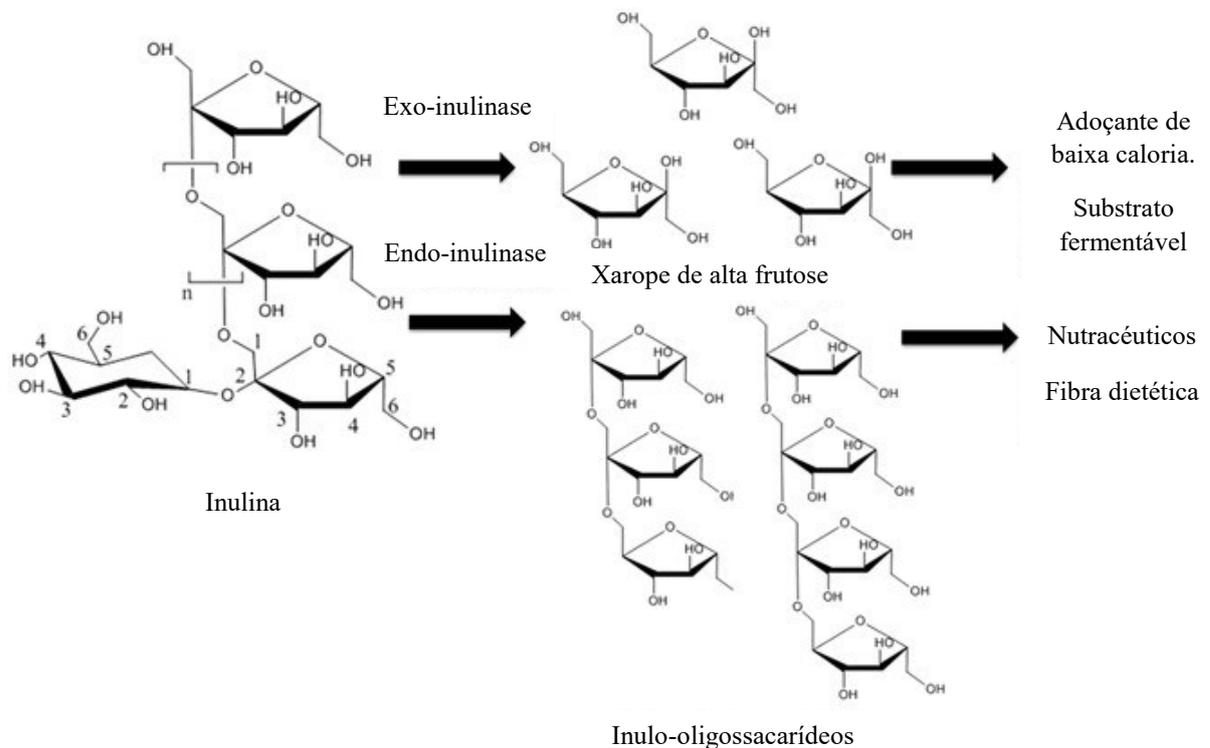


Fonte: Estrutura disponível na base de dados RCSB PDB (*Protein Data Bank*)

<https://www.rcsb.org/3d-view/6J0T/1>

As inulinasas são classificadas como exo-inulinase (β -D-frutano frutohidrolase; EC 3.2.1.80) e endo-inulinase (1- β -D-frutano frutano-hidrolase; EC 3.2.1.7) com base em seu efeito na inulina. A exo-inulinase hidrolisa a unidade terminal de frutose da inulina e produz frutose. Não obstante, a exo-inulinase é conhecida por ter atividade experimental do tipo invertase (sucrase) (EC 3.2.1.26, β -frutofuranosidase); além dos frutanos, apenas uma parte ativa da enzima é responsável pela hidrólise da sacarose (FLEMING; GROOTWASSINK, 1979). A endo-inulinase atua aleatoriamente nas ligações glicosídicas β -2,1 na inulina e gera fruto-oligossacarídeos. As endo-inulinasas, ao contrário das exo-inulinasas, não apresentam atividade de invertase, ou seja, não apresentam atividade significativa em relação à sacarose. Neste sentido, além da frutose, glicose e fruto-oligossacarídeos, as inulinasas são utilizadas na produção de produtos de alto valor agregado, como bioetanol, óleos e proteínas unicelulares, ácido cítrico, ácido glucônico, butanol e sorbitol (SINGH; SINGH, 2010). A Figura 5 apresenta o mecanismo de ação dos dois tipos de inulinase e os produtos resultantes da hidrólise.

Figura 5 – Mecanismo de ação de inulinasas



Fonte: Jiang et al., (2017).

Embora seja assumido que o perfil ativo de uma enzima é caracterizado pelo seu grau de especificidade, a enzima inulinase ou, por vezes, chamado fructanase, possui um determinado grau de afinidade para o substrato utilizado, devido a este comportamento, alguns autores chamam essa enzima de não específica, pois além de hidrolisar a inulina, podem hidrolisar poli-frutanos, levano e sacarose. (SANTHARAM et al. 2017) .

Segundo Arrizon et al. (2011), a inulinase é uma glicoproteína extracelular que hidrolisa sacarose, tanto no interior como no exterior da parede celular em leveduras, em sua investigação mostrou que a enzima tem diferentes afinidades para os substratos testados com uma razão de atividade enzimática da forma “sacarose/inulina (S/I)”, demonstrando que o microrganismo em estudo e a síntese enzimática também dependerá da composição percentual de sacarose e de inulina. Além disso, vários estudos sobre a regulação da síntese de inulinase concluem em que é induzível e sujeitas a repressão catabólica e associada ao crescimento (ROUWENHORST et al. 1988).

3.7 Fermentação em Estado Sólido (FES)

A FES tornou-se uma tecnologia potencial para a produção de complexos enzimáticos (DELABONA et al. 2012). A FES refere-se ao processo em que o crescimento microbiano e a formação do produto ocorrem na superfície de materiais sólidos. Este processo implica a ausência (ou quase ausência) de água "livre"; no entanto, a umidade é absorvida no substrato sólido para favorecer o crescimento e o metabolismo microbiano (ANG et al. 2013; PIROTA; et al. 2014).

A FES é adequada para a produção de enzimas utilizando substratos naturais, tais como resíduos agrícolas, porque eles imitam as condições sob as quais os microrganismos crescem naturalmente (BRAHMACHARI, 2017).

Como a FES envolve relativamente pouco líquido em comparação com FS (Fermentação submersa), o processamento das condições em FES é teoricamente mais simples e menos dispendioso. Pode-se afirmar que a FES tem três vantagens principais: (1) alta produtividade volumétrica, (2) concentração relativamente maior de produtos e (3) menor geração de efluentes, além de uma exigência de equipamentos simples de fermentação (LIU et al. 2012).

Além disso, a FES parece possuir várias outras vantagens biotecnológicas, tais como uma maior estabilidade no produto, menos repressão catabólica, o cultivo de microrganismos

especializados para substratos insolúveis em água, ou a cultura mista de vários fungos, e uma menor demanda de esterilidade devido à baixa atividade de água utilizada (SINGHANIA et al., 2015). Efetivamente, com o uso de uma FES em conjunto com as diversas vantagens que possui, podem ser usadas como a principal protagonista na produção de metabólitos de interesse nas indústrias farmacêutica, alimentícia, cosmética, de combustíveis e têxtil; porém, dificuldades técnicas na operação e controle da fermentação em meio sólido desestimulam o uso desta técnica por sua participação na produção industrial, motivando assim ao desenvolvimento e estudo dos aspectos da engenharia bioquímica da FES (PRADO BARRAGÁN et al., 2016).

No âmbito das investigações relacionadas ao uso de FES estão os fatores importantes envolvidos no bom funcionamento e desempenho do microrganismo utilizado, que são o substrato, o tamanho das partículas do substrato, a atividade da água, a temperatura, a umidade, pH, agitação e aeração. Dentre estes, o tamanho da partícula afeta a área de superfície total do substrato para a relação de volume do substrato e, portanto, ajuda na caracterização do substrato (CHEN, 2013).

À medida que o tamanho da partícula do substrato diminui, a proporção entre a área de superfície e o volume aumenta. Além disso, o espaço vazio também é determinado pelo tamanho das partículas do substrato, o que afeta ainda mais a taxa de transferência de oxigênio. Quando o tamanho das partículas é pequeno, os micróbios obtêm uma superfície maior para seu crescimento. Partículas muito pequenas levam à redução do crescimento e aglutinação de substratos em comparação com partículas maiores, proporcionando melhor oxigênio e troca de calor. Portanto, um tamanho adequado das partículas do substrato deve ser mantido para melhorar o crescimento microbiano e a transferência de massa (SINGH; CHAUHAN; KENNEDY, 2017).

3.8 Microrganismos produtores de inulinase em FES

Devido ao potencial dos microrganismos em produzir diversos compostos enzimáticos, hoje eles são utilizados como importantes fontes potenciais para a produção de inulinase. A fácil manipulação na cultura nutritiva e os altos resultados na atividade enzimática, os transformam em uma fonte biológica industrial de produção enzimática. As inulinasas microbianas são estáveis em altas temperaturas, evitam a contaminação microbiana e apresentam alta solubilidade para diferentes substratos. A principal classe de micróbios envolvidos na produção de inulinase utilizando FES são fungos e leveduras (SINGH et al. 2019).

As cepas mais preferidas e comumente usadas para a produção de inulinase por FES são as cepas fúngicas pertencentes ao gênero *Kluyveromyces* (MAZUTTI et al. 2006) e *Aspergillus* (AL-DABBAGH; A. MAHMOOD, 2015). O primeiro relato de sucesso no emprego de FES para produção de inulinase bacteriana foi de *Staphylococcus sp* (SELVAKUMAR; PANDEY, 1999). Os microrganismos proeminentes produtores de inulinase são *Aspergillus spp.*, *Penicillium spp.*, *Kluyveromyces spp.*, *Candida spp.*, *Arthrobacter spp.*, *Xanthomonas spp.*, *Bacillus spp.*, etc (SINGH; SINGH, 2017).

As inulinasas são enzimas induzíveis e são produzidas extra e intracelularmente. Mas existem alguns microrganismos que têm a capacidade de produzir a enzima nos dois sentidos. A maioria dos microrganismos produz exoinulinase ou endoinulinase (Tabela 2), mas algumas espécies microbianas também são conhecidas por produzir formas mistas (SINGH; SINGH, 2010).

Tabela 2 – Produção de inulinase a partir de materiais vegetais ricos em inulina, em fermentação submersa

Material vegetal utilizado	Micro-organismo	Tipo de Inulinase	Desempenho Inulinase (U/ml)	Referência
Extrato de alcachofra	<i>Pichia caribbica</i>	Exo-inulinase	70,0	Ali et al. (2016)
Extrato de raízes de <i>Asparagus officinalis</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Exo-inulinase	50,2	Singh e Bhermi (2008)
	<i>Aspergillus tritici</i>	Endo-inulinase	25,01	Singh et al. (2016)
Extrato de raízes de <i>Asparagus racemosus</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Exo-inulinase	47,31	Singh et al. (2017)
Extrato de raízes de espargos	<i>Aspergillus awamori</i>	Exo-inulinase	9,58	Rawat et al. (2015a)
	<i>Aspergillus ficuum</i>	Exo-inulinase	5,32	Rawat et al. (2015a)
	<i>Aspergillus niger</i>	Exo-inulinase	7,52	Rawat et al. (2015a)
	<i>Penicillium cinitrum</i>	Endo e exo-inulinase	1,86	Rawat et al. (2015a)
	<i>Penicillium guillermondii</i>	Exo-inulinase	0,54	Rawat et al. (2015a)
Pó de raízes de espargos Extrato de raiz de chicória	<i>Penicillium sp.</i>	Endo e exo-inulinase	45,23	Rawat et al. (2015b)
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Endo-inulinase	1,98	Muslim et al. (2015)
	<i>Aspergillus tamarii</i>	Exo-inulinase	31,79	Ismail Ali saber e El-Naggar (2009)
	<i>Thielavia terrestris</i>	Exo-inulinase	8,42	Fawzi (2011)

Pó de raízes de chicória	<i>Xanthomonas sp.</i>	Endo-inulinase	15,0	Park e Yun (2001)
Extrato de tubérculos dália	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Exo-inulinase	55,4	Singh et al. (2017)
		Exo-inulinase	140,02	Singh et al. (2006)
		Exo-inulinase	1,49	Rawat et al. (2015a)
Pó de alcachofra Jerusalém	<i>Geotrichum candidum</i>	N.E.	45,62	Erdal et al. (2011)
Extrato de raízes de alcachofra Jerusalém	<i>Aspergillus wentii</i>	Exo-inulinase	3,45	Karatop e Sanal (2013)
Extrato de tubérculos de alcachofra Jerusalém	<i>Aspergillus tamarii</i>	Exo-inulinase	28,55	Ismail Ali saber e El-Naggar (2009)

N.E.= Não especificado

Fonte: Singh et al. (2019).

Dentro do âmbito do cenário industrial da produção de enzimas inulinase sintetizados por microrganismos, pode-se dizer que, comercialmente, apenas duas empresas estão produzindo inulinases. A empresa irlandesa Megazyme está produzindo endo-inulinase e exo-inulinase ultrapura purificada por afinidade sob os nomes comerciais de E-Endoian e E-Exoian a partir de cepas recombinantes de *A. niger*. Essas enzimas estão disponíveis separadamente para aplicações de pesquisa e também foram incorporadas aos kits analíticos Fructan e Fructan HK oferecidos pela Megazyme. Outra preparação comercial de exo-inulinase de *A. niger* é comercializada pela Sigma-Aldrich (EUA) sob o nome comercial Fructozyme (SINGH; SINGH, 2017).

3.9 *Kluyveromyces marxianus*

K. marxianus é descrita como uma levedura homotálica, hemiascomiceta, é filogeneticamente relacionada a *S. cerevisiae* e é uma espécie irmã da mais conhecida *Kluyveromyces lactis*. É considerada uma levedura GRAS (*Generally Regarded As Safe*) e QPS (*Qualified Presumption of Safety*) nos EUA e na UE, respectivamente (LANE et al., 2011). Essa levedura tem sido mais amplamente adotada pela indústria, principalmente por apresentar características desejáveis para aplicações biotecnológicas. Isso inclui a capacidade de assimilar açúcares como lactose e inulina; uma taxa de crescimento extremamente rápida, com tempos de geração típicos de ~ 70 min; termotolerância, μ_{\max} de 0,6, com capacidade de crescimento até 52 °C; e uma alta capacidade secretora de enzimas (FONSECA et al., 2008). Na síntese de inulinases extracelulares por leveduras, uma importante característica fisiológica é a localização pós secretória da enzima. Proteínas extracelulares em leveduras são usualmente retidas na

parede celular, mas, dependendo da linhagem e das condições de cultivo, elas podem ser liberadas para o meio (ROUWENHORST et al., 1990).

K. marxianus, é uma levedura respiro-fermentativa e pode gerar energia através do ciclo do TCA (ciclo do ácido tricarbóxico) por fosforilação oxidativa ou por fermentação do etanol. *K. marxianus* é geralmente classificado como Crabtree negativo, em outras palavras, quando a concentração de açúcar é alta, o metabolismo é fortemente direcionado para a fermentação, o que significa que a célula preferencialmente direciona o piruvato para a produção de etanol. Esse fenômeno é chamado de efeito Crabtree e é postulado como uma vantagem competitiva em certos ambientes microbiológicos (PISKUR et al., 2006). Embora *K. lactis* e *K. marxianus* sejam geralmente classificados como Crabtree negativos, ambas as espécies carregam os genes necessários para a produção de etanol por fermentação e sob certas condições irão optar pela rota de fermentação. De acordo com Lane et al., (2011), existem relatos contraditórios na literatura sobre o "status Crabtree" de *K. marxianus*, relatando que essas leveduras apresentam um "efeito Crabtree positivo".

Por outro lado, o potencial de *K. marxianus* aplicado na indústria de biotecnologia varia de acordo com a cepa utilizada. Comercialmente, a aplicação atual mais importante é a produção de enzimas nativas, como inulinase, b-galactosidases, pectinases e celulasas termoestáveis. A inulinase é de particular interesse, pois esta enzima não é comumente encontrada em outras leveduras ou fungos (LANE et al., 2011). Além de algumas novas enzimas, o rápido crescimento e a facilidade de manipulação, tornam o *K. marxianus* um sistema preferível aos fungos filamentosos, que frequentemente são uma fonte alternativa de enzimas fúngicas.

Outro exemplo da aplicação destas leveduras é a sua interessante atividade b-galactosidase que tem sido explorada há algum tempo (PINHEIRO; BELO; MOTA, 2003). *K. marxianus* tem sido utilizado para tratar resíduos contendo lactose da indústria do queijo. O permeado de soro de leite, anteriormente um produto residual problemático, tornou-se um substrato econômico chave para o crescimento de *K. marxianus*, seja para produzir biomassa ou etanol. Sua aplicação para a produção de biomassa ou proteína unicelular utilizada como ração animal ou transformada em extrato, é utilizada na indústria de processamento de alimentos. As linhagens de *K. marxianus* ZIM 1867 na produção de biomassa com ferro (PAS et al., 2007), *K. marxianus* CBS 6556 na produção de proteína unicelular a partir de concentrados de soro de leite desproteinizados (SCHULTZ et al., 2006), *K. marxianus* FII 510700 (LUKONDEH; ASHBOLT; ROGERS, 2005), foram utilizadas para este fim.

Da mesma forma, o interesse pelo etanol é impulsionado pelo desenvolvimento de biocombustíveis, embora os custos associados à destilação signifiquem que a produção de bioetanol a partir do permeado do soro de leite seja atualmente uma atividade comercial marginal (LANE et al., 2011). A linhagem de *K. marxianus* NBRC 1963 no estado suspenso e imobilizado foram utilizadas para a produção de etanol a partir da lactose como substrato obtido a partir desse tipo de resíduo (ODA; NAKAMURA, 2009).

3.10 Substratos utilizados para a produção de inulinase em FES

O tipo de microrganismo e o substrato utilizado para a produção de inulinas desempenham papel importante no tipo de enzima produzida (exo-inulinase ou endo-inulinase), seu modo de ação, e seu rendimento. Substratos com altas concentrações de inulina e sacarose são usadas como fonte de carbono e indutor para a produção de inulinase.

Pode-se afirmar que o principal fator limitante para a produção biológica de uma enzima para aplicação industrial é o custo elevado da matéria prima, custos de operação e custos de extração e purificação. Uma redução significativa no custo da produção industrial de inulinas pode ser alcançada utilizando matéria-prima de baixo custo e alta disponibilidade que seja rica em inulina ou apresentando concentrações altas de sacarose. Diferentes matérias-primas como tubérculos de alcachofra Jerusalém, raízes de aspargos, raízes de dente-de-leão, raízes de chicória e tubérculos de dália, têm sido usadas para a produção de inulinase em fermentação em estado sólido e submersa (SINGH et al. 2019).

Mazutti et al. (2006), avaliou a produção de inulinase por fermentação em estado sólido utilizando *Kluyveromyces marxianus* NRRLY-7571. O meio sólido consistiu de bagaço de cana-de-açúcar suplementado com melaço de cana-de-açúcar e licor de milho; com a máxima atividade enzimática alcançada de 445 (U/g) unidades de inulinase por grama de substrato seco.

Da mesma forma, Xiong et al. (2007), estudou a otimização dos níveis de nutrientes para a produção de inulinase por uma nova estirpe *Kluyveromyces* S120 na fermentação em estado sólido (FES). Foi demonstrado que a inulina, licor de milho e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ são complemento mais compatível com o substrato de farelo de trigo e influenciam positivamente na produção de inulina. O autor obteve assim uma atividade média de inulinase (409,8 U/g de substrato seco inicial).

É notória a profusa literatura encontrada com base em investigações realizadas no âmbito da produção deste tipo de enzimas. A Tabela 3 mostra alguns exemplos até o momento da produção de enzimas inulinase por microrganismos em fermentação sólida e a atividade enzimática máxima alcançada em cada estudo.

Tabela 3 – Microrganismos utilizados para a produção de Inulinase em Fermentação em Estado Sólido (FES).

Microrganismos	Substrato	Atividades máximas (U/gss)*	Referências
<i>Aspergillus niger</i>	Alcachofra de Jerusalém e feijão	11,13	Al-Dabbagh e Mahmood (2015)
<i>Aspergillus niger</i>	Casca de banana	200,0	Narayanan et al. (2013)
	Farelo de arroz	137,2	
<i>Aspergillus niger</i> AUMC 9375	Tubérculos de girassol	0,232	Housseiny (2014)
	Raízes de alface	0,0879	
<i>Aspergillus parasiticus</i>	Bagaço da cana de açúcar	1,773	Abd el Aty et al. (2014)
	Folhas de alcachofra	0,177	
<i>Aspergillus terreus</i>	Resíduos de alho	0,022	Abd el Aty et al. (2014)
	Folhas de alcachofra	4,433	
<i>Aspergillus versicolor</i>	Raízes de chicória	0,177	Abd el Aty et al. (2014)
	Cascas de laranja	1,917	
<i>Cryptococcus aureus</i> G7a	Farelo de trigo e casca de arroz	420,9	Sheng et al. (2009)
<i>Geotrichum candidum</i>	Alho-poró em pó	412,1	Canli e Kurbanoglu (2012)
<i>Kluyveromyces</i> S120	Farelo de trigo	409,8	Xiong et al. (2007)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC-52466	Farelo de trigo (grosseiro)	106,72	Selvakumar e Pandey (1999)
	Farinha de milho	21,23	
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571	Bagaço de cana-melaço de cana- farelo de soja	463,0	Mazutti et al. (2010a)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571	Bagaço da cana-de-açúcar	390,0	Mazutti et al. (2006)

<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571	Farelo de soja e bagaço de cana	436,7	Mazutti et al. (2010b)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7572	Farelo de soja e bagaço de cana	250,0	Mazutti et al. (2007)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571	Bagaço de cana e farelo de soja	586,0	Astolfi et al. (2011)
<i>Penicillium brevicompactum</i>	Folhas de alcachofra	1,241	Aty et al. (2014)
	Resíduos de alho	0,665	
<i>Pichia guilliermondii</i>	Farelo de Trigo e Arroz	291,0	Guo et al. (2009)
<i>Saccharomyces sp.</i>	Farelo de trigo	78,29	Onilude et al. (2012)
	Casca de laranja	22,47	

* U/gss = Unidade enzimática/ grama de substrato seco

Fonte: Das et al. (2019)

É importante apontar que, embora o campo de análise da produção de inulinases seja amplo, a literatura se limita à investigação de outras fontes naturais para a produção de inulinase (yacón, cebola, trigo, etc), e até hoje não foram relatados estudos relacionados com o uso de bagaço residual da indústria cervejeira, em adição ao melaço da cana-de-açúcar na produção dessa enzima.

4 METODOLOGIA

Os procedimentos experimentais foram realizados no laboratório de Microbiologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná UTFPR– Câmpus Toledo/PR. Na Tabela 4 estão apresentados os procedimentos utilizados no desenvolvimento experimental do presente trabalho.

Tabela 4 – Etapas que foram desenvolvidas na Metodologia

Etapa	Procedimento	Variáveis estudadas
1ª Etapa	Caracterização Química do resíduo úmido cervejeiro	Umidade Lignina Hemicelulose Celulose Lipídeos Cinzas Proteínas
	Caracterização Química do melaço de cana	pH Acidez Sólidos solúveis Açúcares redutores Sacarose
2ª Etapa	Pré-tratamento do melaço de cana-de-açúcar	EDTA Carvão ativo Tratamento ácido
3ª Etapa	Ensaio de Fermentação em Estado Sólido	Concentração de melaço de cana pré-tratado. Tempo de fermentação Teor de umidade
4ª Etapa	Efeito das condições de cultivo para a produção de inulinase: Planejamento experimental Plackett-Burman	Temperatura de incubação (°C) pH Inicial Melaço de cana-de-açúcar Extrato de levedura MnSO ₄ .7H ₂ O K ₂ HPO ₄ (NH ₄) ₂ SO ₄ ZnSO ₄ .7H ₂ O Uréia
5ª Etapa	Otimização de variáveis com o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)	Temperatura de incubação (°C)* Concentração do melaço de cana-de-açúcar* Concentração de extrato de levedura*
6ª Etapa	Caracterização parcial da enzima	Temperatura ótima pH ótimo Temperatura de estabilidade pH de estabilidade K _m e V _{max}

* Resultados da etapa do planejamento experimental das condições de fermentação (Quarta etapa).

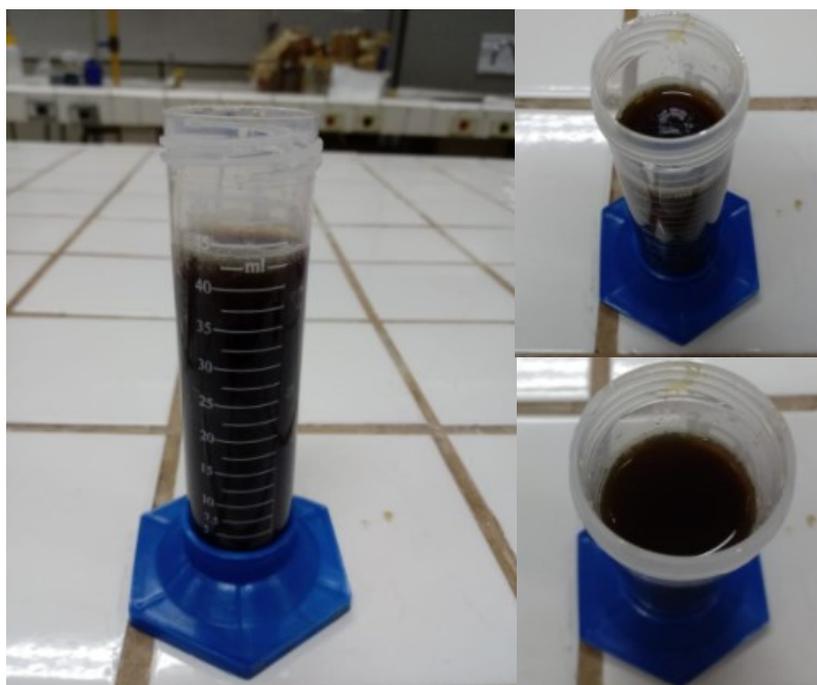
Fonte: Autoria própria

4.1 Substratos

Os substratos industriais utilizados foram o resíduo úmido cervejeiro (RUC), fornecido pela empresa INAB (Indústria Nacional de Bebidas) - Toledo/PR, em conjunto com o melaço de cana-de-açúcar fornecido pela empresa de Açúcar Santa Terezinha Unidade Goioerê-Moreira/PR. O RUC foi depositado em embalagens plásticas à vácuo e mantido em refrigeração a +4 °C. O melaço da cana-de-açúcar foi armazenado em recipientes plásticos de 1 L a temperatura ambiente.

O melaço de cana-de-açúcar foi submetido a caracterização química e tratamentos para a remoção de compostos que afetam negativamente à fermentação, a metodologia está descrita nos itens 4.3.2 e 4.4, respectivamente. O melaço não utilizado no procedimento experimental foi armazenado em frascos plásticos de 100 mL à temperatura ambiente. Na Figura 6 é apresentado o aspecto visual do melaço de cana de açúcar.

Figura 6 – Melaço de cana-de-açúcar utilizado na fase experimental



Fonte: Autoria própria (2019).

4.2 Microrganismo

Para a produção de inulinase foi utilizada a levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 (NCYC 587), da Coleção de Culturas Tropical da Fundação André Tosello, Campinas – SP, fornecida pela Dra. Luciane Sene da Universidade Estadual do Oeste do Paraná- Câmpus Cascavel/PR.

O microrganismo foi mantido em meio “Extrato de levedura-peptona- sacarose-(YPS) 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 a produção de células, o microrganismo foi repicado de ágar inclinado YPS para tubos de ensaio de 50 mL contendo caldo do mesmo meio, em um 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 correspondente ao pré-inóculo 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 Tabela 5 mostra a composição do meio para o inóculo.

Tabela 5 – Meio de cultura para obtenção do inóculo

Componente	Concentração (g.L ⁻¹)
Sacarose	20,0
Extrato de levedura	5,0
K ₂ HPO ₄	5,0
NH ₄ Cl	1,5
KCl	1,15
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,65

Fonte: Treichel (2004)

4.3 Caracterização da matéria-prima

4.3.1 Caracterização Físico-Química do RUC

Para determinar o potencial das macromoléculas presentes no RUC, foi realizada uma análise composicional. O RUC utilizado para a caracterização e fermentação respectivamente, foi o resíduo cervejeiro seco e triturado, para o qual foram realizadas as seguintes etapas:

- Após a colheita foi lavado com água para a remoção dos resíduos do processo de fabricação de cerveja, sendo submetido a secagem a 50 ± 1 °C em estufa SOLAB SL-100 até peso constante. A Figura 7 é apresentado o aspecto visual do resíduo cervejeiro seco.

Figura 7 – Resíduo cervejeiro após secagem



Fonte: Autoria própria (2019).

- Subsequentemente, a fim de reduzir o tamanho, o RUC foi triturado num moinho de facas SOLAB SL-30 e peneirado até um tamanho de partícula entre 10/30 mesh.

O resíduo cervejeiro seco e triturado não utilizado nos experimentos foi armazenado em refrigeração a 7 °C.

4.3.1.1 Determinação do teor de umidade

O teor de umidade do resíduo cervejeiro seco foi determinado pelo método AOAC 930.15 (AOAC, 1990). 2 g da amostra fresca foram colocados em placa Petri (P1) e secados em estufa de secagem SOLAN SL-100 a 135 °C por 2 h. A amostra foi colocada para esfriar em um dessecador para depois ser calculada a massa final (P2). A porcentagem de umidade foi calculada utilizando a Equação 1:

$$\% \text{ Umidade} = ((P1 - P2) / P1) * 100 \quad (1)$$

Onde:

$P1$ = Massa da placa petri somada à massa do RUC fresca.

$P2$ = Massa da placa petri somada à massa do RUC após a secagem em estufa.

4.3.1.2 Determinação do teor de lignina, celulose e hemicelulose

O cálculo da composição de lignina, celulose e hemicelulose foi realizado seguindo a metodologia descrita por Browning (1967) e Rocha et al. (2012). Para a determinação do teor de lignina Klason insolúvel, aproximadamente 3 gramas de amostra seca foram transferidas para um béquer de 50 mL e adicionou-se 10 mL de H₂SO₄ a 72% (m/v), sob agitação, em banho de água (45,0 ± 0,5 °C) por 7 minutos. Interrompeu-se a reação com a adição de 50 mL de água destilada. Imediatamente a amostra foi transferida para um erlenmeyer de 500 mL elevando-se o volume de água a 275 mL (concentração final de H₂SO₄ a 3%). O frasco foi selado e autoclavado a 1 atm, 121 °C durante 45 min. Após autoclavagem, o frasco foi resfriado até temperatura ambiente e o hidrolisado foi filtrado utilizando papel filtro previamente tarado para a retenção da lignina Klason insolúvel. O material retido no papel filtro foi secada em estufa a 105 °C até atingir peso constante e resfriado em dessecador de vidro até atingir a temperatura ambiente e posteriormente pesado. O filtrado foi coletado para quantificação da lignina Klason solúvel. O teor de lignina insolúvel foi determinado pela Equação 2:

$$Lki (\%) = ((m_{ki} - m_{fs})/m_a) * 100 \quad (2)$$

Onde:

Lki = Lignina Klason insolúvel;

m_{fs} = Massa do papel filtro;

m_{ki} = Massa do papel filtro somada à massa de lignina, após a secagem em estufa;

m_a = Massa da amostra.

Para o cálculo das concentrações de celulose e hemicelulose, uma alíquota de aproximadamente 1 mL da fração líquida obtida da filtração do hidrolisado foi analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A solução líquida foi filtrada utilizando filtro Sep Pack C18, a metodologia de medição cromatográfica é descrita no item 4.10.1. De acordo com os procedimentos detalhados por Irick et al. (1988), as concentrações de glicose, xilose e arabinose determinadas por CLAE, foram utilizadas para determinar o cálculo da conversão em porcentagem de celulose e hemicelulose, representadas pelas Equações 3 e 4.

$$\% \text{ Celulose} = \frac{G * 5000 * Fc * Fph}{Pa * Psa} \quad (3)$$

$$\%Hemicelulose = \frac{X * 5000 * Fc * Fph}{Pa * Psa} + \frac{A * 5000 * Fc * Fph}{Pa * Psa} \quad (4)$$

Fc = Fator de conversão (0,9 para a celulose e 0,88 para a hemicelulose)

Fph = Fator de perda de hidrólise (1,055 para celulose e 1,155 para hemicelulose)

Gli, Xil, Ara = Concentração de glicose, xilose e arabinose, respectivamente (g/L)

Pa = Peso inicial da amostra (g)

Psa = Peso seco da amostra (%)

A concentração de lignina solúvel em meio ácido foi analisada através da espectroscopia na região do ultravioleta. As medições de absorvância do filtrado serão realizadas a 215 e 280 nm no espectrofotômetro. O teor (g/L) de lignina Klason solúvel foi calculado pela Equação 5, descrita a continuação:

$$Cls(g.L^{-1}) = ((4,53 * A_{215}) - A_{280})/300 \quad (5)$$

$Cls (g.L^{-1})$ = Concentração de lignina Klason solúvel em meio ácido.

A_{215} = Valor da absorvância a 215 nm.

A_{280} = Valor da absorvância a 280 nm.

O teor de lignina solúvel (%) foi determinado pela Equação 6, sendo que a massa de lignina solúvel seca foi convertida de $g.L^{-1}$ para g pela Equação 7.

$$Lks (\%) = (m_{ks}/m_a) * 100 \quad (6)$$

Onde:

L_{ks} = Lignina Klason solúvel

m_{ks} = Massa de lignina solúvel

m_a = Massa da amostra.

$$m_{ks} (g) = Cls * 0.575 \quad (7)$$

Onde:

m_{ks} = Massa de lignina solúvel;

Cls = Concentração de lignina Klason solúvel em meio ácido obtida na equação 2.
 0.575 = Fator de conversão de g.L^{-1} para g (Como a amostra inicial tem um volume de 575 mL, multiplicando-se a Cls por 0.575 L, se obtém a massa de lignina solúvel (m_{ks})).

4.3.1.3 Determinação do teor de cinzas

O método AOAC 942.05 foi utilizado para determinar o teor de cinzas na amostra lignocelulósica (AOAC, 1990). Um cadinho limpo e seco foi pesado utilizando uma balança analítica SHIMADZU AY224 com 2 g de amostra seca e moída (P1), o material foi aquecido até formar cinza utilizando um forno de mufla por 2 h a 600 °C para depois ser pesada (P2). Para determinar a porcentagem de teor de cinzas, foi calculado pela seguinte Equação 8:

$$\% \text{ Percentagem de cinzas} = ((P1 - P2)/\text{Peso da amostra}) * 100 \quad (8)$$

$P1$ = Somatória da massa do cadinho e os 2 g de amostra seca.

$P2$ = Somatória da massa do cadinho e os 2 g de amostra seca depois do aquecimento.

4.3.1.4 Determinação do teor de proteínas

A porcentagem de proteína foi analisada pelo método Kjeldahl (AOAC 988.05), com algumas modificações. O procedimento é detalhado a seguir: Foram pesados aproximadamente 1 g das amostras que, em seguida, foram transferidos para os tubos de digestão, onde foram adicionados 50 mL de ácido sulfúrico concentrado e 1 g de sulfato de cobre. Os tubos foram transferidos para o digestor de proteínas onde permaneceram até alcançar a temperatura de 350 °C, a digestão foi completada quando a amostra se tornou completamente transparente com uma leve cor esmeralda devido ao cobre no catalisador.

Após a digestão os tubos foram resfriados e seguiram para o destilador de nitrogênio. Durante a destilação, ocorreu a liberação de amônia e sua captura em ácido. Inicialmente a amostra foi diluída com água destilada e neutralizado com hidróxido de sódio a 40%. O nitrogênio total destilado na forma amônia foi recolhido com erlenmeyer contendo 10 mL de solução de ácido bórico a 3% (v/v) com indicador misto verde de bromocresol e vermelho de metila.

Na sequência a solução obtida foi titulada com solução de HCl a 0,1 mol/L com fator de correção 0,9836 até atingir o ponto de viragem identificado pela passagem da coloração azul para a rosada. A equação utilizada para determinação do percentual de proteína está descrita na

Equação 9. Sendo utilizado o fator de conversão para determinação dos resultados de 6,25 e o resultado foi expresso em percentual de proteínas em massa (% p/p).

$$\%Proteínas = 100 * (V * 0,0014 * 6.25 * F)/M \quad (9)$$

V = Volume de HCl gasto na titulação.

F = Fator de correção do HCl 0,1 mol/L

M = Massa inicial da amostra (1 g)

4.3.1.5 Determinação de lipídios

A determinação dos lipídios foi realizada pelo método de Soxhlet, utilizando hexano como solvente, seguida da evaporação do solvente em estufa, de acordo com A.O.A.C. (1994).

2 g de amostra seca foram pesados em cartuchos de papel de filtro e colocados dentro do sifão do equipamento de extração Soxhlet. 150 mL de hexano foram adicionados e transferidos para o balão. O balão foi previamente secado em estufa por 2 h a 105 °C.

O balão foi montado com hexano, o sifão com a amostra a ser analisada e o condensador, o solvente foi aquecido à ebulição e permaneceu em refluxo. O processo foi mantido durante 5 horas (15 sifões por hora). O excesso de solvente foi removido por secagem por 2 h em um forno a 105 °C. Em seguida, o balão foi transferido para um dessecador até que tivesse peso constante. O peso do balão foi calculado antes e após a extração seguindo a Equação 10.

$$\% \text{ Percentagem de Lipídeos} = ((P1 - P2)/P) * 100 \quad (10)$$

$P1$ = Somatória da massa do balão e os 2 g de amostra seca.

$P2$ = Somatória da massa do balão após extração.

P = Massa inicial da amostra

4.3.2 Caracterização Físico-Química do melaço de cana-de-açúcar

4.3.2.1 Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada em solução 10% a 25 °C, em leitura em Potenciômetro digital LUCA-210, em triplicata.

4.3.2.2 Determinação da Acidez

A acidez foi determinada por titulação da amostra em solução 10%, com hidróxido de sódio (NaOH) padronizado a 0,1M. A padronização ocorreu até ser promovido um pH próximo de 8,0 medido por potenciômetro. Os resultados foram calculados utilizando-se a Equação 11:

$$Acidez \left(\% \frac{p}{v} \right) = V \cdot f \cdot \frac{100}{P \cdot c} \quad (11)$$

Onde:

V = volume gasto de hidróxido de sódio 0,1 mol/L

f = fator de correção do hidróxido de sódio 0,1 mol/L

P = g de melão

c = 10 para solução de NaOH 0,1mol/L.

4.3.2.3 Sólidos solúveis (°Brix)

Para a determinação do °Brix do melão o qual representa a porcentagem aparente de sólidos dissolvidos, uma solução de melão de cana-de-açúcar foi preparada em razão de 10% (p/v) em água destilada e sujeita a leitura em um refratômetro de bancada.

4.3.2.4 Determinação do teor de açúcares redutores

Os açúcares redutores totais foram determinados pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS). 1 g de amostra de melão diluída 1/100 foi utilizada para a medição de açúcares redutores. O procedimento utilizando o reagente DNS é detalhado no item 4.10.3. A porcentagem em peso de açúcares redutores presentes na amostra de melão diluída foi calculada usando a Equação 12:

$$Açúcares \text{ redutores} \left(\% \frac{p}{p} \right) = V \cdot C \cdot \frac{100}{P} \quad (12)$$

Onde:

V = Volume da diluição com água destilada da amostra.

C = Concentração de açúcares redutores medido por espectrofotômetro (540 nm) na amostra

P = g de melão

4.3.2.5 Determinação do teor de sacarose

O teor de sacarose foi determinado foi calculado seguindo o método descrito por Fajardo e Sarmiento, (2007), a partir da diferença entre os valores de açúcares redutores (AR) naturalmente presentes no melaço, e os teores de açúcares redutores totais (ART), quantificados após hidrólise ácida, pelo método de quantificação dos açúcares redutores. Portanto, o teor de ART inclui os açúcares redutores naturalmente presentes no caldo, somados aos obtidos por hidrólise da sacarose. A diferença entre AR e ART foi multiplicada por 0,95, fator estequiométrico entre sacarose e os açúcares redutores, fornecendo o teor de sacarose na amostra.

Inicialmente, foi realizado uma curva padrão de sacarose com uma concentração estoque de 10 g/L. A partir desta solução, diferentes concentrações foram preparadas para obter uma curva padrão. Subsequentemente, foram adicionados 2 mL de HCl a 37% (v/v) a um volume de 2 mL de amostra. Os tubos foram agitados e aquecidos a 92 °C por 10 min. A reação foi interrompida com gelo por 20 min. Subsequentemente, três gotas de fenolftaleína foram adicionadas a cada uma das amostras, em conjunto com 5 ml de NaOH a 20% até se obter um tom rosa claro. Finalmente, foram adicionadas 0,6 ml de HCl a 5% (v/v) e agitadas.

As amostras de melaço de cana foram submetidas ao mesmo procedimento, para determinar o teor de sacarose. As amostras de açúcares redutores foram lidas em espectrofotômetro, utilizando a metodologia DNS.

4.4 Ensaios de Pré-tratamento

O objetivo desta seção foi remover a porcentagem máxima de compostos inibitórios (metais e compostos minerais) presentes no melaço de cana-de-açúcar, para os quais são detalhados três procedimentos de tratamento: carvão ativado, EDTA e tratamento com ácido sulfúrico. Para avaliar os diferentes tratamentos no melaço de cana-de-açúcar, realizou-se uma fermentação líquida com medição de duas respostas, atividade enzimática de inulinase (U/mL) e crescimento microbiano por densidade ótica (DO), traduzido em concentração de biomassa (g/L). Os tratamentos aplicados à melaço de cana-de-açúcar foram realizadas segundo a metodologia de Treichel (2004), utilizando frascos Erlenmeyers aletados de 500 mL, com 100 mL do meio tratado a ser estudado. A avaliação dos tratamentos com carvão ativo, EDTA e ácido sulfúrico, foram realizados utilizando o meio líquido conformado por melaço de cana-de-açúcar tratado, juntamente com extrato de levedura e peptona, sendo a concentração do meio

expressa na Tabela 6. Da mesma forma, foi realizada uma fermentação sem tratamento em triplicata, com a mesma composição do meio de fermentação do tratamento.

Tabela 6 – Composição do meio de fermentação para o tratamento

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

Fonte: Adaptado de Treichel (2004).

A temperatura foi mantida em 36 °C (KABKE, 2002), em frascos agitados em uma incubadora refrigerada com agitação orbital THOTH modelo 6430, com rotação de 150 rpm e pH inicial 5,0. A cada frasco foi adicionado 10% de inóculo. A resposta atividade enzimática foi avaliada em 72 h de fermentação, enquanto a concentração de biomassa foi avaliada durante este período.

4.4.1 Tratamento com carvão ativado

Para o desenvolvimento do tratamento foi utilizado carvão ativado comercial em pó (Cromoline Química Fina). Os pré-tratamentos foram realizados com base nos resultados obtidos por Treichel (2004). Foi utilizado melaço de cana-de-açúcar diluído para a concentração especificada na Tabela 6 e adicionado carvão ativo em pó nas concentrações de 3%, 5%, 8% e 10% p/v. O tempo de contato e agitação foi de 90 min a 150 rpm a uma temperatura de 60 °C. Após o tempo de tratamento, o caldo foi filtrado duas vezes e subsequentemente centrifugado a 5000 rpm durante 15 min, com o objetivo de remover o maior número de partículas de carvão ativado do meio.

4.4.2 Tratamento com Ácido Sulfúrico

Para avaliar a eficiência do tratamento com ácido sulfúrico, foram realizados dois tratamentos no melaço de cana-de-açúcar diluído (100 g/L). O primeiro tratamento foi realizado com base nos resultados obtidos por Sguarezi et al. (2009). O pH da solução de melaço de cana-de-açúcar (100 g/L) foi ajustado com ácido sulfúrico 1 M a 5,0. A solução foi colocada em repouso a 24 °C por 24 h utilizando uma incubadora Ethiktechnology modelo 411/FDP 86. O meio foi centrifugado a 5000g por 15 min e o pH final ajustado a 4,0 com NaOH 1,0 M. O segundo pré-tratamento foi baseado nos resultados de Roukas (1998), nos quais apenas as

condições de ajuste do pH foram variadas. Foi utilizado ácido sulfúrico 1 M para ajustar o pH do caldo a 3,0, a amostra permaneceu em repouso por 24 h, para depois ser centrifugado e reajustado o pH para 5,5 com NaOH 1,0 M. O experimento foi realizado em triplicata, utilizando um meio controle sem tratamento.

4.4.3 Tratamento com EDTA

Para avaliar a eficiência quelante do ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) no pré-tratamento, foram realizados experimentos seguindo a metodologia de Roukas (1998), estabelecendo algumas modificações. A solução de melão foi ajustada para pH 5,5 com HCl 5 N e aquecida a 60 °C por 15 min. O líquido foi tratado enquanto estava quente com diferentes concentrações de EDTA (100, 200, 300 e 400 ppm) e um experimento de controle, para estimular a precipitação de metais pesados. A mistura foi mantida em repouso durante 24 h à temperatura ambiente e depois centrifugou-se a 5000 g durante 20 min. O sobrenadante foi utilizado para fermentação. O experimento foi realizado em triplicata, utilizando um meio controle sem tratamento.

4.5 Ensaios de Fermentação em Estado Sólido

Antes da análise dos fatores mais importantes utilizando o Planejamento Plackett-Burman, deve-se levar em consideração a variabilidade das condições de teste e a divergência nos insumos utilizados como matéria-prima na parte experimental. Atualmente, é conhecida a profusa versatilidade de informação bibliográfica empregada por diferentes estudos para a produção de inulinas, nas quais utilizam diferentes fontes de carbono, diferentes microrganismos e até diferentes condições de ensaio fermentativo (condições de substrato sólido ou líquido).

Assim, foi proposta a execução de três ensaios preliminares com o objetivo de conhecer intervalos gerais de trabalho, que ajudam a entender o comportamento da cepa *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 e a atividade enzimática da enzima inulinase, sendo submetida a análises simples de variação na concentração de melão de cana-de-açúcar, variação no tempo de fermentação e variação na umidade do meio sólido.

Análises preliminares da fermentação em estado sólido foram realizadas seguindo a metodologia de Mazutti et al. (2006), na qual foram propostas algumas modificações. Os experimentos foram realizados utilizando frascos Erlenmeyer de 500 mL, adicionando 5g de resíduo de cerveja úmida (RUC) como fase sólida, que foi integrada ao melão de cana-de-

açúcar diluído (100 g/L) como indutor enzimático. O valor do pH foi ajustado para 5,5 e a umidade do meio foi ajustada de acordo com o volume adicionado de melaço de cana, com 65% p/p sendo o valor percentual de umidade base para os experimentos em que não foi avaliado este parâmetro.

Cada meio de fermentação foi esterilizado a 121 °C por 20 min. Os frascos estéreis, uma vez em temperatura ambiente, foram inoculados com uma suspensão de células, na qual foram contadas aproximadamente 10^8 células/mL. 2 mL da suspensão de células foram inoculados assepticamente no meio de fermentação sólido. Finalmente, os meios de fermentação foram colocados em uma câmara de incubação LUCA-222 a 32 °C, sem agitação. Deve-se levar em conta que todas as condições experimentais se desenvolveram em triplicata. Também foram realizados frascos de controle para descontar a atividade enzimática já presente no inóculo, sendo sua atividade medida após a inoculação.

4.5.1 Efeito da concentração de melaço de cana-de-açúcar

Foi avaliada a concentração de melaço pré-tratado com ácido sulfúrico na produção de inulinase para determinar em qual faixa de concentração apresenta maiores atividades enzimáticas sem apresentar possíveis efeitos de inibição por substrato. Foram testadas concentrações de melaço de cana-de-açúcar na faixa entre 0% de melaço até 60% p/p. Foi adicionado ao meio sólido (5 g de RUC) o inóculo de 24 h de crescimento, a temperatura de incubação foi de 32 °C por 72 h. A atividade inulinase foi calculada após o tempo de fermentação.

4.5.2 Efeito do tempo de fermentação

A avaliação do curso do tempo na produção de inulinase foi realizado de acordo com a metodologia proposta por Onilude (2012), com algumas modificações. Ao meio sólido constituído por resíduo úmido cervejeiro suplementado com melaço de cana-de-açúcar (50% p/p) como indutor enzimático, foi adicionado o inóculo de 24 h e incubado a 32 °C durante 120 h. A produção de inulinase foi monitorada em intervalos de 24 h, analisando a atividade enzimática inulinase durante o período de fermentação (120 h).

4.5.3 Efeito do teor inicial de umidade

O efeito do teor inicial de umidade foi testado utilizando a metodologia proposta por Onilude (2012), estabelecendo algumas modificações. Oito diferentes níveis iniciais de umidade (50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 e 90%) foram criados separadamente e adicionados ao

substrato sólido composto por RUC. Os níveis de umidade foram realizados de modo a ajustar uma concentração de melação de cana de 50% p/p. Finalmente, em cada frasco foi inoculado com 2 mL de inóculo, como é especificado acima. A fermentação foi realizada por 72 h a 32 °C, após o qual foi determinada a atividade da inulinase.

4.6 Efeito das condições de cultivo para a produção de inulinase

Para avaliar o efeito das variáveis (físicas e componentes do meio) que influenciaram significativamente na produção de inulinase foi utilizado um planejamento experimental Plackett-Burman com 12 ensaios experimentais. O planejamento experimental Plackett-Burman consiste no uso de dois níveis, que localizam variáveis significativas ao rastrear as variáveis "n" nos experimentos "n + 1" (KARLAPUDI et al., 2018). Cada variável independente foi testada em dois níveis, alto e baixo, indicados com (+) e (-), respectivamente. Na Tabela 7 são apresentadas as nove variáveis atribuídas às variáveis físicas e nutricionais tendo um total de 12 unidades experimentais (PB-12). A análise dos resultados foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA), com o uso do programa Statistica 10.0 assumindo $p < 0,05$, utilizando como resposta a atividade enzimática às 72 h e 75% de umidade inicial do meio (variáveis fixas que foram definidas nos ensaios de fermentação em estado sólido, item 4.5).

Tabela 7 – Planejamento experimental de Plackett-Burman para variáveis físicas e nutricionais na produção de inulinase por *K. marxianus* ATCC 36907 em FES.

Variável físicas e nutrientes		Níveis	
Código de Variável	Variável	Baixo (-1)	Alto (+1)
A	Temperatura de incubação (°C)	25	35
B	pH inicial	4,5	7,5
C	Melaço de cana-de-açúcar (% p/p)	10	50
D	Extrato de levedura (g/5gss)*	0,01	0,05
E	MnSO ₄ ·7H ₂ O (g/5gss)*	0,01	0,025
F	K ₂ HPO ₄ (g/5gss)*	0,01	0,025
G	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/5gss)*	0,02	0,05
H	ZnSO ₄ ·7H ₂ O (g/5gss)*	0,02	0,05

I	Uréia (g/5gss)*	0,02	0,05
---	-----------------	------	------

* Valores expressos em gss = gramas de substrato seco.

Fonte: Autoria própria (2021).

4.7 Otimização das condições físicas e nutricionais na produção de Inulinase utilizando Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR)

Após análise do efeito das nove variáveis no planejamento Plackett-Burman (PB-12), foram selecionadas as variáveis mais significativas em relação à análise da atividade inulinase. Foi aplicado um Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), que foi utilizado para otimizar as condições de produção de inulinase, sendo as variáveis de Temperatura de incubação, concentração de melaço de cana e concentração de extrato de levedura, as variáveis consideradas para esta fase experimental.

Após a medição das respostas, cada uma foi ajustada a um modelo polinomial independente de segunda ordem, que foi usado para representar graficamente as superfícies de resposta, como mostra a Equação 13.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ij} x_i x_j + \sum \beta_{ii} x_i^2 \quad (13)$$

, onde Y é o valor de resposta previsto (atividade enzimática otimizada), β_0 é o coeficiente de termo constante, β_i é o coeficiente de efeito linear, β_{ii} é o coeficiente de efeito quadrático, β_{ij} é o coeficiente de interação dos efeitos, x_i e x_j são os níveis codificado das variáveis X_i e X_j .

A Equação 14 apresenta a relação entre x_i e o valor verdadeiro da variável independente X_i :

$$x_i = \frac{X_i - X_0}{\Delta X_i} \quad (14)$$

, sendo assim X_0 , o valor real da variável independente no ponto central do teste e ΔX_i a mudança de etapa da variável independente.

Os ensaios foram realizados utilizando o planejamento experimental estabelecido na Tabela 8. Utilizando o DCCR 2³, com seis pontos axiais, oito pontos fatoriais e três pontos centrais, foram obtidos um número total de 17 unidades experimentais.

Tabela 8 – Faixa de valores dos fatores avaliados para a otimização da produção de inulinase utilizando o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).

Delineamento experimental	Variáveis	Níveis				
		-1,682	-1	0	+1	+1,682
	Temperatura de incubação (°C)	28,6	32,0	37,0	42,0	45,4
DCCR	Melaço de cana-de-açúcar (% p/p)	33,2	40,0	50,0	60,0	66,8
	Extrato de levedura (g/5 gss)*	0,07	0,1	0,15	0,2	0,23

* Valores expressos em gss = gramas de substrato seco.

Fonte: Autoria própria (2021).

A validação do modelo matemático e a cinética de produção enzimática foi avaliada nos pontos ótimos de operação determinados no planejamento DCCR para a levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907, na fermentação em estado sólido foi considerado a cinética da fermentação até o tempo de 96h (4 dias).

4.8 Extração da enzima inulinase produzida por *K. marxianus* ATCC 36907

A enzima produzida foi extraída de acordo com o método de Mazutti et al., (2006). A cada frasco Erlenmeyer utilizado na fermentação sólida, foi adicionado tampão acetato de sódio (0,1 M; pH 4,8) em uma proporção equivalente a dez vezes por grama de suporte utilizado (1:10) (p/v), para depois ser incubada a 30 °C com agitação a 150 rpm por 30 min. O conteúdo foi então filtrado através de papel de filtro Whatman N° 1 e centrifugado a 5000 g por 10 min para favorecer a separação de resíduos sólidos ou células no extrato. A atividade enzimática foi analisada a partir do extrato obtido.

4.9 Caracterização parcial da enzima inulinase

Os testes descritos a seguir foram realizados utilizando o extrato enzimático sem purificação prévia, proveniente do procedimento de extração (item 4.8).

4.9.1 Determinação do pH ótimo e temperatura ótima

Na determinação da temperatura e pH ótimos da enzima inulinase produzida por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907, com a sacarose como substrato; foi realizado um DCCR², apresentando 4 pontos axiais, 4 pontos fatoriais e 4 pontos centrais, para um total de

12 unidades experimentais. As faixas estudadas para pH (4,3-5,7) e temperatura (47,9 °C-62,1 °C) foram escolhidas com base nos resultados da literatura. A Tabela 9 mostra os valores utilizados no DCCR, com níveis altos (+1) e baixos (-1) e (0) como ponto central, para cada variável independente. Os valores ótimos para pH e temperatura foram determinados por análise de superfície de resposta.

Tabela 9 – Valores utilizados no DCCR 2² para determinação de pH e temperatura ótima da enzima inulinase.

Variáveis independentes	Níveis				
	-1,414	-1	0	+1	+1,414
pH	4,3	4,5	5	5,5	5,7
Temperatura (°C)	47,9	50	55	60	62,1

Fonte: Autoria própria (2021).

4.9.2 Temperatura de Estabilidade

A estabilidade térmica da enzima inulinase foi determinada utilizando a equação de Arrhenius, onde relaciona a constante de velocidade (K) dependente da temperatura como é especificada na Equação 15.

$$K = A \cdot e^{-Ed/RT} \quad (15)$$

Os testes de estabilidade térmica foram realizados de acordo com a metodologia proposta por Treichel, (2004), divididos nas três etapas seguintes:

1. Acompanhamento da atividade da inulinase em função do tempo de incubação em diferentes temperaturas.
2. Cálculo da energia de desativação para a reação de desnaturação (Ed).
3. Cálculo do tempo de reação decimal.

Para o acompanhamento da atividade inulinase em função do tempo e da temperatura, a solução enzimática foi diluída em tampão acetato de sódio 0,1M, pH 4,8; as soluções enzimáticas foram incubadas sob diferentes condições de temperatura (50,0; 52,5; 55,0; 57,5; 60 °C). Para a medição da atividade enzimática, as amostras foram retiradas em diferentes intervalos de tempo. A constante de inativação térmica K_d (constante cinética dependente da temperatura) foi estimada a partir dos dados obtidos experimentalmente em função do tempo, utilizando a Equação 16, através do seguinte ajuste linear:

$$\ln At = \ln At_0 - K_d t \quad (16)$$

, onde:

At_0 = Atividade enzimática do estado inicial (U/mL)

At = Atividade enzimática referente aos tempos de retirada de amostra (U/mL)

K_d = Constante de desativação da enzima (h^{-1})

t = Tempo de incubação da solução enzimática (h)

Para o cálculo da energia de desativação da enzima (E_d), foi utilizado o ajuste linear da Equação 15 (Eq. de Arrhenius), que por sua vez foi determinada por meio do gráfico do logaritmo natural da constante de inativação térmica ($\ln K_d$) - calculado do valor determinado no passo anterior - dependendo do valor inverso da temperatura ($1/T$). Na Equação 17 se apresenta o ajuste linear da Eq. De Arrhenius para o cálculo da E_d .

$$\ln K_d = \ln K - \left(\frac{E_d}{RT}\right) \quad (17)$$

, sendo que:

K_d = Constante de desativação da enzima (h^{-1})

K = Constante de proporcionalidade (h^{-1})

E_d = Energia de desativação enzimática

R = Constante dos gases ideais ($8,314 \text{ kJ.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$)

T = Temperatura absoluta (K)

O tempo de redução decimal, ou *valor-D*, é definido como o tempo, a temperatura e pressão constantes, necessário para uma redução de 90% da atividade inicial. Para reações de primeira ordem, o *valor-D* é inversamente proporcional à constante da taxa de inativação, sendo esta expressada na Equação 18:

$$D = 2,303/K_d \quad (18)$$

4.9.3 pH de estabilidade

Os testes para o pH de estabilidade foram realizados utilizando 1 mL da solução enzimática devidamente diluído, a 1 mL de solução tampão, incubada a 50 °C em banho-maria, com os seguintes valores de pH: 4,0; 4,5; 4,8; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0 e 7,5, as soluções tampão foram, tampão aceto de sódio 0,1 M (para pH 4,0-5,5) e tampão fosfato (para pH 6,0-7,5). A concentração de sacarose para a medição da atividade enzimática permaneceu a mesma em todos os testes (2% p/v). As amostras foram retiradas periodicamente e a atividade residual

medida em termos de atividade residual, que foi calculada como a razão percentual da atividade em um determinado pH. O cálculo da atividade enzimática foi realizado conforme especificado no item 4.10.5. A determinação da atividade enzimática residual foi calculada de acordo com a Equação 19:

$$\text{Atividade enzimática residual (\%)} = \frac{U_{\text{final}}}{U_{\text{inicial}}} * (100) \quad (19)$$

, onde:

U_{final} = atividade enzimática após o período de incubação

U_{inicial} = atividade enzimática antes do período de incubação.

4.9.4 Determinação das constantes cinéticas

Para a determinação das constantes cinéticas (K_m e V_{max}), foi utilizado o método gráfico de Linewaver Burk, modelo recíproco da equação de Michealis e Menden (Equação 20). Os ensaios de atividade enzimática foram realizados utilizando tampão acetato de sódio 0,1 M, temperatura de 55 °C e pH 5,0 (condições estabelecidas no item 5.8.1), em diferentes concentrações de sacarose em mg/mL (1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4, 0; 5,0; 7,5; 10,0; 15,0; 20,0). As constantes cinéticas foram calculadas a partir da inclinação da reta e o intercepto formado a partir do gráfico $1/S$ em função de $1/V$, sendo S a concentração do substrato e V , a atividade enzimática.

$$V = \frac{V_{\text{max}} \cdot S}{K_m + S} \quad (20)$$

4.10 Métodos Analíticos

4.10.1 Determinação da concentração de glicose, xilose, arabinose

As concentrações de glicose, xilose, arabinose, foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Resolução (CLAE), em um equipamento Waters nas seguintes condições: detector de índice de refração, coluna Bio-Rad Aminex HPX-87H (300 x 7,8 mm), temperatura de 45°C, ácido sulfúrico 0,01N como eluente em um fluxo de 0,6 ml.min⁻¹ e volume de amostra de 20 µL. Antes de serem injetadas no cromatógrafo, as amostras foram diluídas com água deionizada e filtradas em filtros Sep Pak C18 (Millipore). As concentrações dos compostos foram calculadas a partir de curvas de calibração obtidas com soluções padrão.

4.10.2 Determinação do pH

Os valores de pH das amostras foram determinados utilizando um potenciômetro Potenciômetro digital LUCA-210, com correção de temperatura.

4.10.3 Determinação de açúcares redutores

A determinação dos açúcares redutores foi realizada pelo método do ácido-dinitrosalicílico (DNS), para o qual foram retirados 0.5 mL da amostra e 0.5 ml do reagente DNS, os tubos foram submetidos em ebulição por 5 minutos. A reação foi extinta utilizando gelo, para logo ser adicionado 5 mL de água destilada. A homogeneização foi realizada em vórtex, e subsequentemente a absorvância foi medida utilizando um comprimento de onda de 540 nm. Para conhecer as concentrações das soluções em estudo, foi realizado previamente uma curva padrão de soluções de frutose com concentrações conhecidas, com base em uma solução estoque de 1 g/L.

4.10.4 Determinação de biomassa seca

O crescimento celular da levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 foi acompanhado por medida da densidade ótica a 600 nm em espectrofotômetro Merck modelo Pharo 100. Após propagação, as células foram recuperadas por centrifugação e lavadas por 2 vezes com água destilada. As células foram suspensas em 100 mL de água destilada (suspensão mãe) e a partir de uma série de diluições, padronizou-se a concentração celular por densidade ótica. A concentração celular foi determinada utilizando uma equação obtida por regressão linear dos dados entre peso seco e a absorvância a 600 nm.

Com auxílio de uma bomba de vácuo, para a determinação do peso-seco, filtrou-se 10 mL da suspensão mãe através de um sistema de filtração Millipore com membrana 0,45 µm, previamente pesada. Secou-se a membrana em micro-ondas Electrolux modelo MEF 41, até peso constante. O procedimento foi realizado em duplicata. Para a determinação da concentração celular da suspensão mãe, utilizou-se a Equação 21.

$$C = 1000 * (M_f - M_i) / V \quad (21)$$

, onde:

C= Concentração celular da suspensão mãe

M_f = Massa final

M_i = Massa da membrana 0,45 µm

V = Volume da solução mãe

Para calcular a concentração celular de cada amostra diluída foi utilizada a Equação 22:

$$Cd = C/f \quad (22)$$

Onde:

Cd = Concentração celular da amostra diluída

C = Concentração celular da suspensão mãe

f = Fator de diluição

4.10.5 Determinação da atividade enzimática do extrato

A atividade da inulinase foi determinada medindo os açúcares redutores liberados pela hidrólise da sacarose, seguindo a metodologia proposta por Xiong et al., (2007), com modificações. O ensaio foi realizado utilizando 0,5 mL de extrato enzimático adequadamente diluído com solução tampão e adicionado a 4,5 mL de solução de sacarose (2%, p/v) em 0,1 M de tampão acetato a pH 4,8, e 50 °C durante 10 min, para depois parar a reação fervendo a amostra por 10 min. A mistura da reação foi analisada visando reduzir os açúcares na forma de frutose para ser analisado posteriormente pelo método DNS. Uma curva de calibração foi preparada com soluções de frutose de concentração conhecida. Uma unidade de atividade da inulinase é definida como a quantidade de enzima, que produz 1 mol de frutose sob as condições do ensaio. Os resultados da determinação da atividade da inulinase foram apresentados em unidades de atividade enzimática/gramas de substrato seco (U/g).

As inulinases também têm atividade invertase associada à atividade inulinase, que é descrita pela razão de atividade em sacarose/ atividade em inulina em termos de S/I. Um valor da relação S/I inferior a 100 é característico do comportamento das inulinases (ETTALIBI; BARATTI, 1987). Sob essas considerações, a atividade da inulinase também foi determinada usando inulina 2% (p/v). As análises anteriores de fermentação no estado sólido, bem como as análises de otimização, foram realizadas determinando apenas a atividade hidrolítica na sacarose. Seguindo as mesmas condições descritas acima, a atividade sobre a inulina foi determinada na condição ótima, assim como a atividade sobre a sacarose (validação do modelo otimizado), item 5.6.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Caracterização da matéria-prima

A produção de inulinase é induzida pela presença de nutrientes no substrato. Assim, a caracterização do Resíduo Úmido Cervejeiro (RUC) e do melaço de cana-de-açúcar, visou conhecer sua composição com relação ao conteúdo de nutrientes que são importantes na síntese enzimática.

5.1.1 Caracterização do Resíduo Úmido Cervejeiro (RUC)

A composição química do RUC utilizado no presente trabalho após a secagem, é apresentada na Tabela 10, os valores percentuais dos componentes são expressos como uma porcentagem em peso seco (% p/p).

Tabela 10 – Composição química do Resíduo úmido cervejeiro (RUC)

Componente	Peso Seco (% p/p)
Celulose	18,629 ± 0,913
Hemicelulose	26,596 ± 2,709
Xilana	18,885 ± 2,252
Arabinana	7,711 ± 0,457
Lignina	16,498 ± 0,058
Proteínas	21,164 ± 0,513
Lipídeos	9,291 ± 0,805
Cinzas	4,803 ± 0,009
Outros (Extrativos)	3,019

Fonte: A autoria própria (2021).

A porcentagem de umidade do RUC foi de 72%. Resultado semelhante ao presente estudo foi relatado por Cordeiro (2011), em seu estudo sobre a caracterização e viabilidade econômica do bagaço de malte oriundo de cervejarias, obteve um teor percentual de umidade de 75,45% em base úmida. Segundo Ascheri et al., (2007), o bagaço de malte (componente principal do resíduo úmido cervejeiro), caracteriza-se por possuir um alto teor de umidade, em torno de 86% em base úmida. Da mesma forma, Lense e Schmidt (1989), indicaram que o bagaço de malte possui umidade em torno de 79%, valor consistente com a literatura.

Como pode-se observar na Tabela 10, o RUC, é composto principalmente por (% p/p): Celulose ($18,629 \pm 0,913$), Hemicelulose ($26,596 \pm 2,709$), Lignina ($16,498 \pm 0,058$), Proteínas ($21,164 \pm 0,513$), Lipídeos ($9,291 \pm 0,805$) e Cinzas ($4,803 \pm 0,009$).

De acordo com Mussato et al., (2006), o resíduo úmido cervejeiro pode ser considerado uma rica fonte de proteína e fibra, que corresponde a 20 e 70% de sua composição, respectivamente. Em síntese, o RUC contém a casca e as camadas externas do grão de cevada, tornando-o um material heterogêneo rico em arabinosilano, celulose e lignina. Sua parede celular composta por polissacarídeos pode ser submetida a um processo de degradação em seus constituintes correspondentes por procedimentos hidrolíticos (hidrotérmicos, enzimáticos ou ácidos).

Nesse sentido, o teor percentual de celulose foi semelhante ao descrito por Mello (2014), que detalha um teor percentual de 18,54% em base seca; os valores de hemicelulose (11,48%), lignina (14,65) e proteína (32,07%) foram também indicados em seu estudo. Os dados correspondentes ao teor percentual de fibra detergente neutro (FDN), neste estudo, que corresponde à soma dos valores de celulose, hemicelulose e lignina, representaram 61,72% em base seca; valor semelhante ao encontrado por Carvalho et al., (2017), no qual indicam um valor para o FDN de 55,98%.

O teor percentual de proteína foi equivalente a 21,164% p/p. Os resultados apresentados por Kanauchi et al., (2001), detalham o teor percentual de proteína equivalente a 24% em base seca, valor semelhante ao indicado por Carvalho et al., (2017), que indicam 24,44% de proteína em grãos cervejeiros gastos; assim também, estudos como o realizado por Mussatto e Roberto, (2005) detalham um percentual equivalente a 15,2% em proteína para o RUC.

Consequentemente, foi determinado também o conteúdo lipídico do resíduo cervejeiro, o qual foi calculado pelo método de extração Soxhlet obtendo-se um valor de 9,291% p/p, valor que apresentou similaridade com os resultados encontrados na literatura. De acordo com estudos recentes, o teor lipídico total (TL) do resíduo úmido cervejeiro varia entre 5,40 e 11,00% (massa seca). Apenas pequenas alterações na composição de ácidos graxos ocorrem durante a maltagem e a trituração e, portanto, a composição de ácidos graxos do RUC é semelhante à da cevada (FĂRCAŞ et al., 2015). O alto teor de ácidos graxos livres no RUC pode ser atribuída à lipase endógena, que pode liberar ácidos graxos livres de triacilgliceróis e lipídios polares durante o processo de maltagem e a maceração (NIEMI et al., 2012).

Em linhas gerais, a variação dos resultados no âmbito da composição química do RUC deve-se principalmente ao tipo de grão de cevada utilizado e ao processo industrial pelo qual é submetido. Assim, a composição típica de RUC encontrada na literatura é variável, mas sempre inclui altos níveis de fibra alimentar, proteína e aminoácidos particularmente essenciais, além de níveis apreciáveis de minerais, polifenóis e lipídios (MUSSATTO; DRAGONE; ROBERTO, 2006).

Um aspecto importante, desde o ponto de vista fermentativo e nutricional, é que esse subproduto merece ser levado em consideração para usos subsequentes como fonte nutricional para o crescimento de diversos microrganismos devido a seu alto teor de proteínas, o que o atribui a ser uma importante fonte de nitrogênio para formulações de meios de cultura. A biomassa composta por RUC também pode ser explorada e utilizada mediante processamento microbiano para obter diferentes tipos de enzimas e ácidos orgânicos valiosos. Sob o mesmo ponto de vista, o RUC pode ser ainda mais explorado como matéria-prima para formulações de ingredientes funcionais para o desenvolvimento de novas gerações de produtos alimentícios de valor agregado como suplemento animal ou também para produção de energia por combustão direta ou produção de carvão vegetal.

5.1.2 Caracterização do melaço de cana-de-açúcar

Os valores dos resultados obtidos para a amostra de melaço analisado com relação aos parâmetros químicos estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11 – Composição química do Melaço de cana-de-açúcar

Análises químicas	Melaço de cana-de-açúcar
pH	5,95 ± 0,1
Acidez (% p/v)	1,87 ± 0,07
Sólidos solúveis (°BRIX)	79,82 ± 2,05
Açúcares redutores (% p/p)	14,46 ± 0,58
Sacarose (% p/p)	38,37 ± 1,03

Fonte: Autoria própria (2021).

De acordo com a Tabela 11, verifica-se que a maioria dos resultados obtidos durante a caracterização química foram numericamente semelhantes aos descritos pela Especificação Técnica para o melaço de cana líquida brasileiro (MELAÇOS BRASILEIROS, 2020). O valor de pH na amostra analisada foi de 5,95 ± 0,1, um valor próximo à especificação técnica, que

detalha um valor de pH de 5,7. Para esse parâmetro, são esperados valores de pH ácido, pois se aproximam dos valores do caldo de cana *in natura* (pH = 5,5) (SILVA, 2012b).

A acidez da amostra foi de $1,87 \pm 0,07\%$ p/v, valor ligeiramente superior ao valor descrito na especificação técnica (1,3% p/v). Esse valor foi semelhante ao relatado por Araújo (2017), no qual especifica faixas de acidez de diferentes amostras de melaço de cana-de-açúcar entre 1,23% e 4,9% p/v. Por sua vez, os sólidos solúveis contidos na solução de melaço apresentaram um teor percentual de $79,82 \pm 2,05\%$, sendo esse valor de acordo com a literatura (JOSEPH; BACHHAWAT, 2014) e muito semelhante à especificação técnica (82,92%).

Por outro lado, observou-se que o conteúdo de açúcares redutores (glicose e frutose) era equivalente a 14,46% p/p e o conteúdo de sacarose de 38,37% p/p. O melaço de cana utilizado neste trabalho apresentou 52,83% p/p de açúcares totais, consistindo principalmente de sacarose em maior porcentagem. Os resultados mostram similaridade com o descrito na especificação técnica do melaço líquido brasileiro, sendo o valor indicado de açúcares redutores totais (glicose, frutosa e açúcares redutores produto da hidrólise da sacarose), equivalente a 59,16% p/p; da mesma forma, Feltrin et al., (2000), relataram um teor percentual de açúcares redutores de 14,72% p/v e açúcares redutores em sacarose de 33,78% p /v, semelhantes aos valores encontrados neste estudo.

5.2 Pré-tratamento do melaço de cana-de-açúcar

Foram realizados três pré-tratamentos diferentes para o melaço de cana-de-açúcar (tratamento com carvão ativado, tratamento ácido e EDTA). Os resultados do melhor pré-tratamento realizado no melaço de cana-de-açúcar foram medidos indiretamente, calculando-se a atividade enzimática às 72 h de fermentação e o acompanhamento da concentração de biomassa durante 72 h.

5.2.1 Tratamento com carvão ativado

5.2.1.1 Efeito na Atividade enzimática

Os resultados do pré-tratamento para o melaço de cana-de-açúcar com carvão ativado em diferentes concentrações são representados na Tabela 12, os ensaios foram avaliados utilizando meios de fermentação submersos. A composição do meio líquido de fermentação, bem como as condições ambientais (pH, temperatura e tempo), estão especificadas no item 4.4. Os experimentos foram realizados em triplicata, considerando as médias e os desvios-padrão dos resultados de atividade inulinase.

Tabela 12 – Resultados das atividades enzimáticas dos diferentes tratamentos com carvão ativado para o melaço de cana-de-açúcar por fermentação submersa.

Tratamento com Carvão Ativado	Atividade enzimática (U/mL)
Sem tratamento	32,226 ± 1,1
Tratamento C.A. 3%	39,818 ± 0,8
Tratamento C.A. 5%	44,862 ± 1,4
Tratamento C.A. 8%	66,617 ± 1,2
Tratamento C.A. 10%	50,654 ± 2,4

Fonte: Autoria própria (2021).

Para determinar a distribuição dos dados de cada amostra e determinar sua variabilidade estatística por meio da comparação das médias dos grupos, foi realizada a análise de variância ANOVA e o teste de Tukey (Apêndice A). O ANOVA dos parâmetros avaliados da concentração de carvão ativado em função da atividade inulinase, não mostrou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). O análise *post hoc*, por meio do teste HSD de Tukey (Apêndice A), indicou diferença significativa entre todos os grupos analisados ($p < 0,05$).

Na Tabela 12 observa-se que, a maior atividade inulinase foi obtida em todos os tratamentos com carvão ativado em comparação com o meio não tratado; a maior atividade inulinase encontrada ($66,617 \pm 1,256$ U/mL) foi alcançada utilizando um meio pré-tratado com carvão ativado a 8% p/v. O uso de carvão ativado no pré-tratamento do melaço significou um aumento da atividade enzimática, o que pode ser explicado devido à natureza altamente adsorvente em relação à sua porosidade e à formação de grupos funcionais específicos com os metais presentes no melaço da cana de açúcar. Quanto à aparência física do melaço de cana, esta apresentou aspecto cristalino após da separação do carvão ativado por filtração, deduzindo assim que este método afetou de forma positiva devido à não formação de precipitados no caldo.

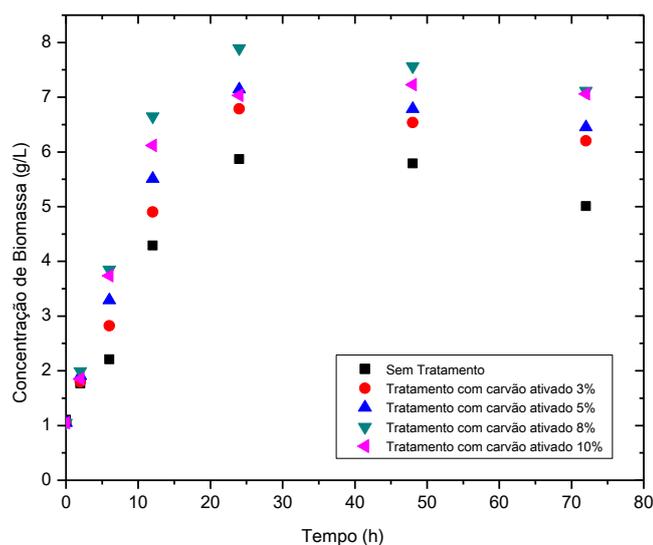
Treichel (2004), ao contrário dos resultados especificados neste trabalho, afirma que a porcentagem de carvão ativado adicionado ao melaço de cana não foi significativa na faixa estudada entre 6 a 10%, ou seja, 6% do carvão teria o mesmo efeito que 10%, porém, também definiu que o teste com carvão ativado ANF 8% (Carvorite, Irati, PR, Brasil), durante 1 hora de agitação a 70 °C, era o mais adequado para o tratamento da solução conjunta de melaço de cana e licor de milho fermentado, para a produção de inulinase.

Por outro lado, além da utilização do carvão ativado como tratamento de resíduos para síntese enzimática, podem ser encontrados na literatura estudos baseados em seu uso para aumentar a produção de metabólitos por fermentação. Estudos realizados por Pan et al., (2017), ao utilizar carvão ativado para o tratamento do melaço de cana-de-açúcar na concentração de 12% p/v, resultaram em aumento de 19% do ácido hialurônico em relação ao substrato sem tratamento. Os resultados relatados por este autor sugeriram que o pré-tratamento com carvão ativado diminuiu o nível de inibição por fatores prejudiciais, como o excesso de íons metálicos, e aumentou a qualidade da fermentação.

5.2.1.2 Efeito na Concentração de Biomassa

Na Figura 8 observa-se o acompanhamento da concentração de biomassa em função do tratamento com carvão ativado a diferentes concentrações.

Figura 8 – Acompanhamento da concentração de biomassa em função de tempo de fermentação utilizando meios de cultura com tratamento com carvão ativado.



Fonte: Autoria própria (2021).

Foi possível evidenciar que o crescimento celular é exponencial nas primeiras 24 horas de fermentação, a biomassa aumentou até atingir a concentração de 7,89 g/L utilizando um tratamento com 8% de carvão ativado; é importante destacar que utilizando esta mesma concentração no teste anterior, foi possível obter a maior atividade enzimática em relação às demais concentrações de carvão ativado. (Tabela 12).

Os tratamentos nas concentrações de 3, 5 e 10% de carvão ativado, apresentaram comportamentos semelhantes com relação à concentração de biomassa, apresentando também uma fase exponencial até 24 h de fermentação e uma fase estacionária de crescimento constante

até 72 h. Os resultados mostram uma clara melhoria em relação à fermentação sem tratamento (5,87 g/L de concentração de biomassa).

Ressalta-se que, da mesma forma que com os dados obtidos sobre a atividade enzimática, a influência do tratamento com carvão ativado tem papel relevante na adsorção de compostos inibitórios presentes no melaço de cana, que claramente afetaram negativamente ao crescimento microbiano e diminuíram a atividade enzimática.

5.2.2 Tratamento com EDTA

5.2.2.1 Efeito na Atividade enzimática

Os resultados da atividade enzimática do extrato obtido da fermentação submersa com melaço de cana-de-açúcar pré-tratado com diferentes concentrações de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) são mostrados na Tabela 13.

Tabela 13 – Resultados das atividades enzimáticas dos diferentes tratamentos com EDTA para o melaço de cana-de-açúcar por fermentação submersa.

Tratamento com EDTA	Atividade enzimática (U/mL)
Sem tratamento	30,315 ± 1,901
Tratamento 100 ppm	40,049 ± 1,106
Tratamento 200 ppm	56,563 ± 0,937
Tratamento 300 ppm	42,939 ± 0,423
Tratamento 400 ppm	38,756 ± 1,122

Fonte: Autoria própria (2021).

O ANOVA dos parâmetros avaliados da concentração de EDTA em função da atividade inulinase, mostrou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), indicando que os tratamentos com carvão ativado aplicados ao melaço de cana-de-açúcar apresentam similaridade estatística em função da atividade da inulinase. Por outro lado, através do análise *post hoc*, por meio do teste HSD de Tukey (Apêndice B). Observa-se que não existe diferença significativa ($p > 0,05$) entre os grupos 1 (Tratamento com EDTA 100 ppm) e o grupo 3 (Tratamento com EDTA 300 ppm), assim como os grupos 1 e 4 (Tratamento com EDTA 400 ppm), apresentados em preto. Os grupos restantes dos tratamentos com EDTA utilizados mostraram diferença significativa ($p < 0,05$).

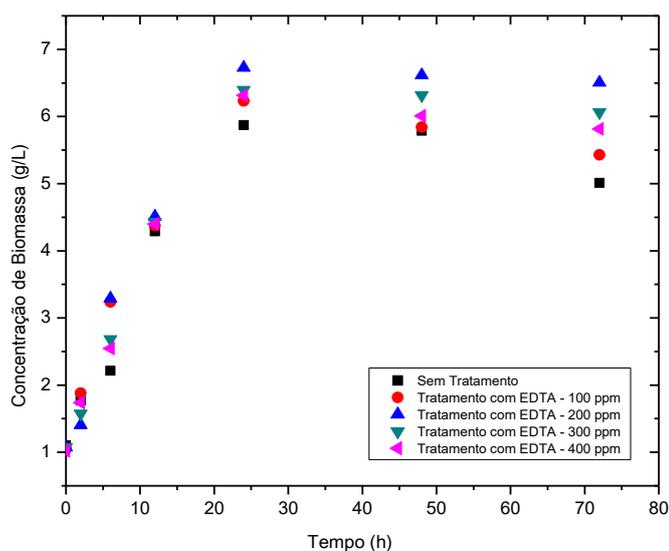
Observa-se que o tratamento para o melaço de cana-de-açúcar com 200 ppm de EDTA foi aquele que resultou em uma maior atividade inulinase. Pode ser observado na Tabela 14,

que houve diminuição da atividade enzimática quando foi aumentado a concentração de EDTA nos ensaios tratados com 300 ppm e 400 ppm de EDTA. O aumento da atividade da inulinase em todos os ensaios em relação ao meio de controle pode ser explicado devido à propriedade do EDTA de apresentar atividade quelante muito eficaz. A formação de quelatos permitiria a formação de complexos com a maioria dos íons metálicos especialmente fortes, como o Mn, Fe, Pb, Cu e Co, íons presentes no melaço de cana-de-açúcar. Valencia e Zapata, (2014), ao utilizar EDTA para a remoção de Cálcio e Magnésio, determinaram um percentual de clarificação de 58,73%, ou seja, obteve-se uma remoção superior a 50% desses dois compostos. Ashraf e Ali (2015), por outro lado, mostram a capacidade do EDTA e do ferrocianeto de potássio como agentes complexantes no tratamento do melaço de cana, visando melhorar a produção de ácido cítrico pelo microrganismo *Aspergillus niger* NG-4. Seus resultados apontam um tratamento com EDTA a 250 ppm como o ideal para a produção máxima desse metabólito.

5.2.2.2 Efeito na Concentração de Biomassa

Na Figura 9, da mesma forma que o caso anterior, é observada uma condição comparativa da concentração de biomassa em função do tempo de fermentação utilizando diferentes concentrações de EDTA.

Figura 9 – Acompanhamento da concentração de biomassa em função de tempo de fermentação utilizando meios de cultura com tratamento com diferentes concentrações de EDTA.



Fonte: Autoria própria (2021).

Foi possível demonstrar que o crescimento celular é exponencial nas primeiras 24 horas de fermentação, a biomassa aumentou para uma concentração de 6,72 g/L utilizando tratamento com EDTA em uma concentração de 200 ppm; concentração de EDTA no pré-

tratamento com o qual foi obtida a maior atividade enzimática em comparação com os outros testes (Tabela 13).

A fermentação realizada sem tratamento atingiu um máximo de 5,88 g/L, valor próximo a 6,22 g/L de concentração de biomassa obtida usando pré-tratamento com 100 ppm. Por sua vez, pode-se concluir também que existe uma estreita relação entre a concentração de biomassa e a atividade enzimática, uma melhora na concentração de biomassa significou um melhor valor da atividade enzimática inulinase, possivelmente devido à natureza da enzima, sendo sua produção considerada diretamente associada ao crescimento.

5.2.3 Tratamento ácido

5.2.3.1 Efeito na Atividade enzimática

Os resultados das atividades enzimáticas dos dois tratamentos ácidos avaliados, juntamente com o tratamento controle, estão representados na Tabela 14.

Tabela 14 – Resultados das atividades enzimáticas dos diferentes pré-tratamentos com ácido sulfúrico para o melaço de cana-de-açúcar por fermentação submersa.

Tratamento com Ácido Sulfúrico	Atividade enzimática (U/mL)
Sem Tratamento	32,638 ± 0,559
Tratamento 1: pH inicial 3 / pH final 5,5	113,934 ± 1,399
Tratamento 2: pH inicial 5 / pH final 4,0	129,082 ± 1,513

Fonte: Autoria própria (2021).

O ANOVA e o teste de Tukey dos parâmetros avaliados (Tratamentos ácidos) em função da atividade inulinase são mostrados no Apêndice C, os análises estatísticos indicaram que os tratamentos com ácido sulfúrico aplicados ao melaço de cana-de-açúcar não apresentam similaridade estatística entre os tratamentos testados em função da atividade da inulinase ($p < 0,05$).

Pode-se observar que os tratamentos ácidos apresentaram diferenças em relação ao tratamento controle, sendo o tratamento 2 ajustado para pH inicial 5 e pH final 4, aquele que apresentou maior atividade enzimática ($129,082 \pm 1,513$ U/mL), seguido pelo tratamento 1 ajustado para pH inicial 3 e pH final 5,5 ($113,934 \pm 1,399$ U/mL) e, finalmente, o tratamento controle ($32,638 \pm 0,559$ U/mL). Infere-se que a propriedade dos ácidos para reagir com a maioria dos metais para a formação de sulfatos e subsequente separação destes por

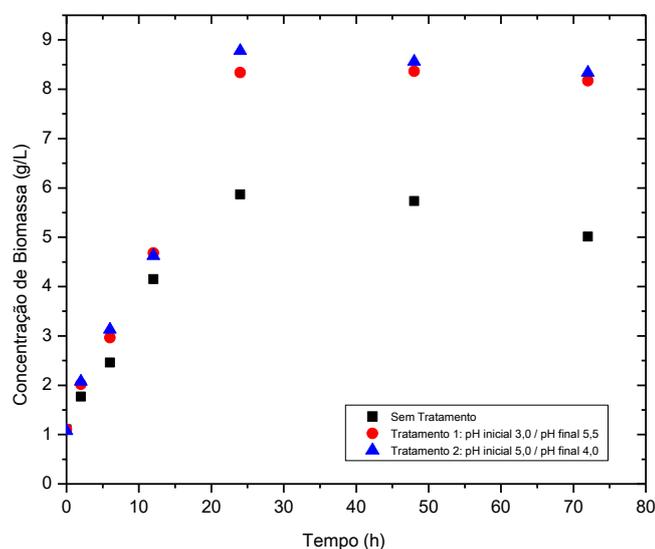
centrifugação, influenciam positivamente na melhoria da atividade da enzima. Sguarezi (2007), realizou tratamentos com ácido ao melaço de cana-de-açúcar, mostrando que efetivamente o tratamento com ácido sulfúrico ajustando o pH inicial em 5,0, por 24 h e pH final em 4,0, foi o mais efetivo na clarificação do substrato aumentando a atividade enzimática.

Nesse sentido, com o objetivo de maximizar a resposta da atividade enzimática inulinase, a utilização de tratamentos ácidos aplicados ao melaço de cana-de-açúcar pode ser uma alternativa favorável para este propósito. Mazutti (2009) e Golunski (2017) aplicaram condições de tratamento ácido ao melaço de cana-de-açúcar para otimizar a maximização da produção de inulinase, sugerindo assim que as substâncias no melaço são inibidoras na produção enzimática e podem ser removidas com sucesso com este método.

5.2.3.2 Efeito na Concentração de Biomassa

Na Figura 10, pode-se observar o gráfico da influência de diferentes condições de tratamento com ácido sulfúrico em diferentes valores de pH.

Figura 10 – Acompanhamento da concentração de biomassa em função de tempo de fermentação utilizando meios de cultura com tratamento com ácido sulfúrico



Fonte: Autoria própria (2021).

Na Figura 10, pode ser observado que houve diferença na concentração de biomassa em relação ao ensaio sem tratamento. A concentração máxima de biomassa alcançada foi de 8,78 g/L, obtida com o pré-tratamento ácido ajustando o pH inicial em 5,0 e o final em 4,0. Utilizando o tratamento ácido ajustado para pH inicial 3,0 e pH final em 4,0, foi alcançado uma concentração máxima de biomassa de 8,33 g/L.

Ambos os pré-tratamentos não apresentaram variação da concentração de biomassa, sendo ambos os tratamentos considerados adequados para induzir a formação de complexos com os compostos inibidores do melaço de cana-de-açúcar e favorecer tanto o crescimento da levedura quanto a atividade enzimática.

5.2.4 Análise comparativo dos diferentes tratamentos ao melaço de cana-de-açúcar

A escolha do melhor tratamento para o melaço de cana-de-açúcar baseou-se nos melhores resultados da atividade enzimática e na influência na concentração de biomassa. A Tabela 15 apresenta os dados comparativos entre os melhores resultados de atividade enzimática por tratamento utilizado, sendo o tratamento ácido o melhor tratamento baseado na atividade inulinase em $129,082 \pm 1,513$ U/mL, seguido do tratamento com carvão ativado 8% de $66,617 \pm 1,256$ U/mL e o tratamento com 200 ppm de EDTA, resultando em atividade inulinase em $56,563 \pm 0,937$ U/mL.

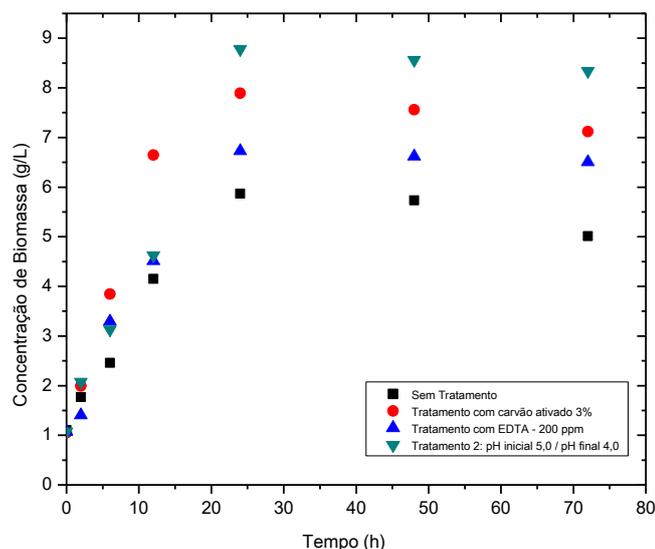
Tabela 15 – Resultados comparativos dos melhores tratamentos aplicados ao melaço de cana-de-açúcar em função da atividade inulinase por fermentação submersa.

Tratamento utilizado	Atividade enzimática (U/mL)
Tratamento com carvão ativado 8%	$66,617 \pm 1,256$
Tratamento com EDTA 200 ppm	$56,563 \pm 0,937$
Tratamento com ácido sulfúrico.	$129,082 \pm 1,513$
pH inicial/pH final	

Fonte: A autoria própria (2021).

A Figura 11 apresenta a gráfica comparativa dos melhores resultados em relação à concentração de biomassa por tratamento utilizado. Da mesma forma que no caso anterior, o melhor tratamento do melaço de cana em relação à concentração de biomassa produzida foi o tratamento ácido, resultando em uma concentração de biomassa máxima de 8,78 g/L, seguido do tratamento com carvão ativado com 7,89 g/L e finalmente tratamento com EDTA com 6,72 g/L, nas 24 h de fermentação.

Figura 11 – Gráfica comparativa do acompanhamento da concentração de biomassa em função de tempo de fermentação utilizando os diferentes pré-tratamentos.



Fonte: Autoria própria (2021).

A utilização de carvão ativado, EDTA e ácido como metodologias de tratamento para o melaço de cana-de-açúcar, apresentaram uma clara melhoria em relação à atividade enzimática resultante e à concentração de biomassa. Com base nos resultados dos testes anteriores, foi definido que o melaço de cana-de-açúcar dever ser tratado com ácido sulfúrico 0,1 M ajustando o pH inicial em 5,0 por 24 h em temperatura ambiente, seguido por um ajuste final de pH em 4,0.

É importante mencionar que as metodologias de tratamento para o melaço de cana, além de favorecerem resultados favoráveis referentes a altas atividades enzimáticas, devem favorecer certas condições que afetam positivamente uma posterior purificação enzimática. Treichel (2004), utilizando carvão ativado como metodologia de tratamento do melaço de cana-de-açúcar, apresentou grande dificuldade na clarificação do meio de tratamento, apresentando resíduos de carvão no meio filtrado, prejudicando a atividade enzimática.

Uma solução alternativa para resolver esse inconveniente pode basear-se em tomar algumas considerações físicas do carvão escolhido, ou seja, enfatizar a busca de outras especificações de carvão ativado que possuam uma área superficial maior para melhorar suas propriedades adsorventes.

Da mesma forma, em relação aos tratamentos ácidos, além do tratamento com ácido sulfúrico, outras opções de tratamento podem ser escolhidas, como o ácido fosfórico, que possui propriedades complexantes, contribuindo assim para a clarificação do meio e aumento da atividade inulinase. Sguarezi (2007), evidenciou que o melhor tratamento aplicado ao licor de

milho fermentado, substrato industrial utilizado como fonte de nitrogênio na síntese de diferentes enzimas, foi com ácido fosfórico ajustando o pH inicial em 3,0 por 24 h a 24 °C, seguido por um ajuste final de pH a 5,5.

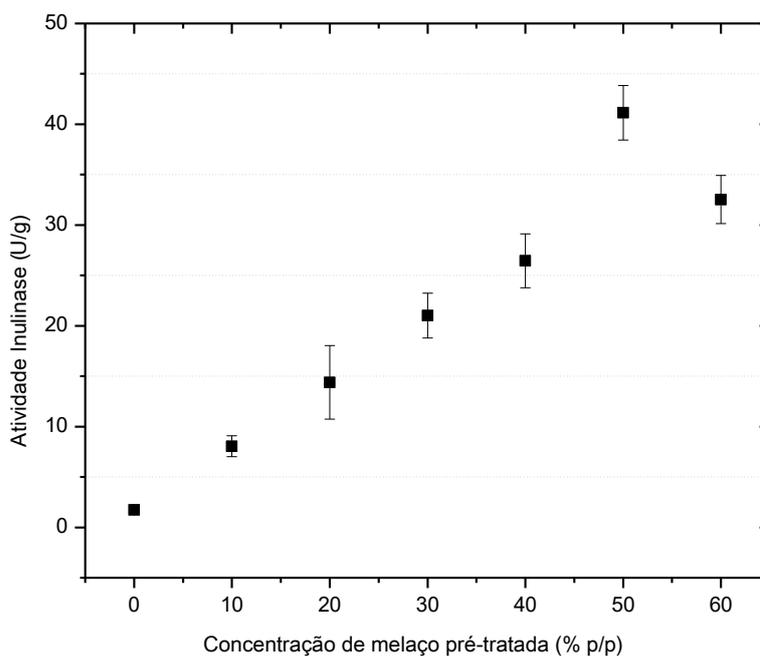
5.3 Ensaios de Fermentação em Estado Sólido (FES)

A execução dos três ensaios preliminares descritos no item 4.5 são apresentados a continuação. É importante destacar que os resultados obtidos por meio das seguintes análises detalhadas nesta seção serviram como base para definir condições iniciais do meio de fermentação sólido nas análises de otimização (Plackett-Burman e DCCR).

5.3.1 Efeito da concentração de melaço pré-tratado na atividade inulinase

Os resultados do efeito da concentração de melaço de cana-de-açúcar na FES são apresentados na Figura 12.

Figura 12 – Efeito da concentração de melaço de cana-de-açúcar pré-tratado na produção de inulinase por *K. marxianus* ATCC 36907 por fermentação em estado sólido



Fonte: Autoria própria (2021).

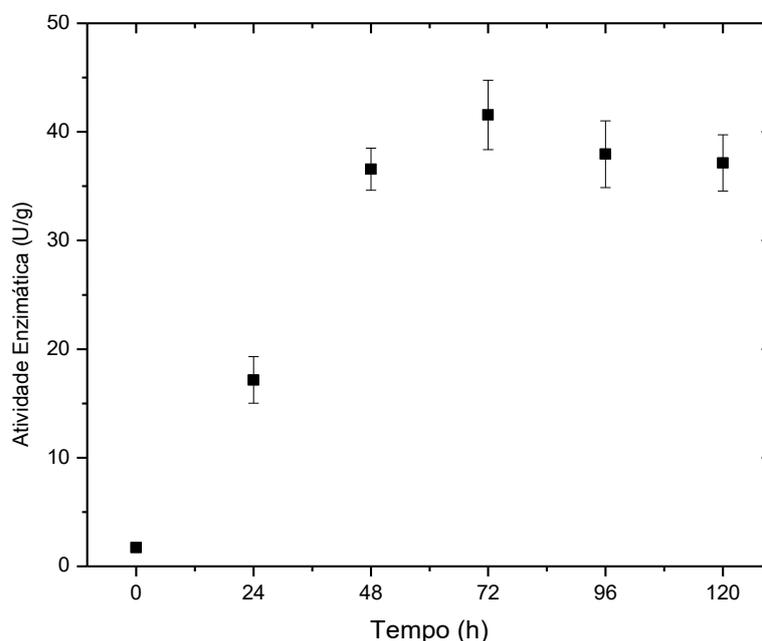
Os resultados mostraram que houve aumento da atividade enzimática à medida que a concentração de melaço aumentou (50% p/p), até atingir um valor máximo de $41,138 \pm 2,705$ U/g às 72 h de fermentação. Do mesmo modo, utilizando uma concentração de melaço de cana pré-tratada de 60% p/p, foi observada um claro declínio da atividade enzimática ($32,526 \pm 2,381$ U/g), apresentando diminuição de aproximadamente 20% em relação à concentração anterior utilizada. Na Figura 12, pode ser evidenciado um comportamento de repressão catabólica

devido à alta concentração de sacarose, principal componente do melaço de cana. Pode-se afirmar que a inulinase produzida por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 é aparentemente regulada por um mecanismo de repressão do substrato, saturando os sítios ativos da enzima. Resultados semelhantes foram encontrados por Cazetta et al., (2010), que estudaram as condições de cultivo sobre a produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*, concluindo que a inulinase produzida por essa levedura é regulada por um duplo mecanismo: aumento pelo substrato e repressão pelo produto (glicose e frutose), visto que a atividade da inulinase encontrada por esses autores diminuiu com concentrações de sacarose superiores a 10 g/L (em fermentação submersa), provavelmente suprimido por açúcares redutores.

5.3.2 Efeito do tempo na atividade inulinase

Os resultados do efeito do tempo de fermentação na atividade inulinase são apresentados na Figura 13.

Figura 13 – Efeito do tempo de fermentação na produção de inulinase por *K. marxianus* ATCC 36907 por fermentação em estado sólido



Fonte: Autoria própria (2021).

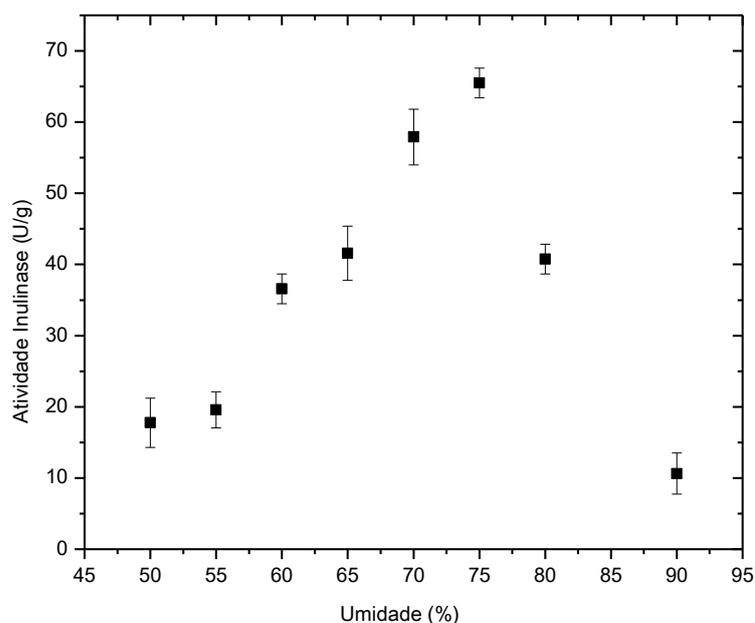
Os resultados evidenciaram um aumento na atividade enzimática até às 72 h. A atividade máxima inulinase apresentada utilizando uma concentração de melaço de cana-de-açúcar em 50% p/p foi de $41,562 \pm 3,19$ U/g às 72 horas de fermentação; chegadas às 96 h pode-se observar uma clara diminuição da atividade, comportamento semelhante ao encontrado

às 120 h. Os dados encontrados na experimentação estão de acordo com os obtidos por Mazutti et al., (2009), o quais indicam que a atividade enzimática máxima inulinase é encontrada nas 72 h de fermentação. Nesse contexto, alguns autores relatam que a síntese de inulinase por diferentes microrganismos, dentre os quais se destacam o gênero *Kluyveromyces* e *Saccharomyces*, está associada ao crescimento e atinge uma fase máxima quase estacionária (AL-DAGAL; BAZARAA, 1998). Por outro lado, a diminuição enzimática às 96 h, justificase na possibilidade de depleção do substrato (melaço de cana) ou repressão catabólica; outra possibilidade muito bem fundamentada é a presença ou secreção de proteases, causando hidrólise de proteínas, inibindo assim as enzimas sintetizadas (ONILUDE; FADAHUNSI; GARUBA, 2011). Deve-se levar em consideração que os dados apresentados, são dados de efeitos totalmente simples, com variação de uma única variável de estudo, sendo este o tempo de fermentação. As variáveis otimizadas que corresponderão a uma atividade enzimática máxima serão avaliadas nos experimentos subsequentes, sendo estas realizadas e calculadas através da interação das variáveis mais importantes durante a fermentação.

5.3.3 Efeito do teor de umidade inicial na produção de inulinase

O efeito das diferentes porcentagens do teor de umidade inicial no meio de fermentação sólido está representado na figura 14.

Figura 14 – Efeito do teor de umidade inicial do meio de cultura sólido na produção de inulinase por *K. marxianus* ATCC 36907 por fermentação em estado sólido



Fonte: Autoria própria (2021).

A atividade enzimática máxima encontrada foi de $66,98 \pm 2,091$ U/g, utilizando meio de cultura com 75% de umidade inicial com 72 h de fermentação, por outro lado, os menores valores de atividade foram encontrados utilizando 50% e 90% da umidade inicial do meio, apresentando atividades de $17,76 \pm 3,45$ U/g e $10,61 \pm 2,89$ U/g, respectivamente. Os valores mínimos de atividade enzimática podem estar relacionados ao grau de disponibilidade de nutrientes resultante de um aumento no volume do meio sólido. O grau de expansão (aumento de volume) no sistema sólido foi baixo em um nível de umidade mais baixo e, portanto, o aumento do estresse hídrico reduz a solubilidade dos nutrientes. Por outro lado, o nível mais alto de umidade produz alterações nos substratos que reduzem a porosidade, o que contribui para a adesão e as trocas gasosas (HAWASHI; WIDJAJA; GUNAWAN, 2019).

É importante enfatizar que a fermentação em estado sólido permite o crescimento e o cultivo de microrganismos sob condições controladas na ausência de água livre e que os fungos filamentosos se adaptam melhor às condições sólidas, devido à boa tolerância a baixos valores de atividade da água (A_w) e condições de alta pressão osmótica (RAIMBAULT, 1998). O uso de leveduras, como é o caso do presente trabalho, também apresenta vantagens importantes em relação ao uso de fungos filamentosos na fermentação. *Kluyveromyces marxianus* é uma levedura versátil, devido à sua tolerância térmica, altas taxas de crescimento e amplo espectro de substrato, podendo ser economicamente explorada para uma ampla gama de aplicações, incluindo a produção de várias enzimas e a produção de proteínas unicelular, usando uma matriz sólida (HERRERA et al., 2017).

5.4 Efeito das condições de cultivo para a produção de inulinase

O planejamento estatístico Plackett-Burman é mais frequentemente usado para estudar os efeitos de diferentes variáveis independentes em um meio de fermentação para a produção de enzimas. No presente estudo, foi utilizado para analisar o efeito de nove variáveis, incluindo as condições de fermentação e a constituição do meio na produção de inulinase (Tabela 7).

Na Tabela 16, são especificados os valores codificados das variáveis utilizadas em cada nível da matriz do planejamento, juntamente com a atividade enzimática inulinase de cada experimento. Em resposta à produção de inulinase pela levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907, observou-se variação na produção da enzima de 16,42 a 131,37 U/g. Essa variação reflete a importância de otimizar o meio para obter maior produtividade.

Tabela 16 – Planejamento Plackett-Burman (12 ensaios) para seleção de variáveis físicas e nutrientes do meio de cultivo com a atividade inulinase como variável resposta.

Ensaio	Variáveis									Atividade Enzimática (U/g)
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	
1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	111,665
2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	69,312
3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	40,411
4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	131,370
5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	61,744
6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	72,254
7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	67,685
8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	98,528
9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	79,822
10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	85,391
11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	19,706
12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	16,421

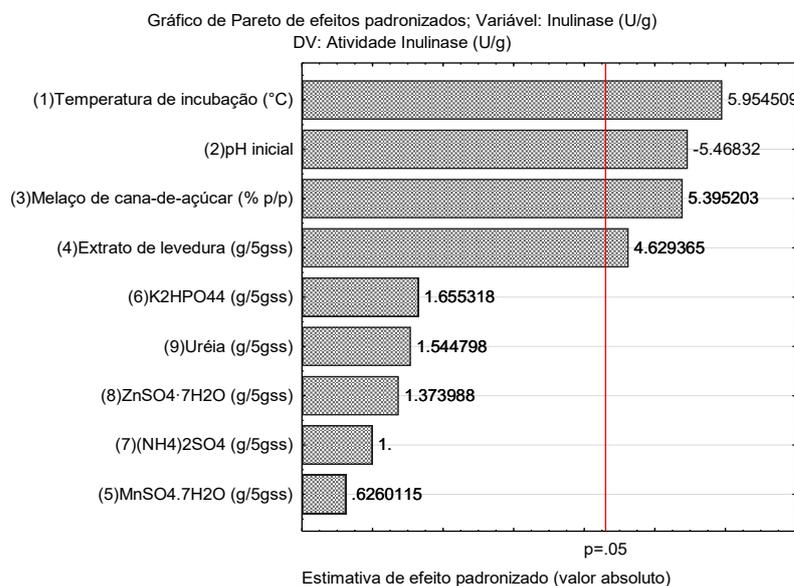
Nota: Os sinais +1 e -1 representam os dois níveis diferentes (alto e baixo) da variável independente sob investigação. As faixas experimentais de cada variável, estão expressos na Tabela 7. A: Temperatura de incubação; B: pH inicial; C: Melaço de cana-de-açúcar; D: Extrato de levedura; E: $MnSO_4 \cdot 7H_2O$; F: K_2HPO_4 ; G: $(NH_4)_2 SO_4$; H: $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$; I: Uréia

Fonte: Autoria própria (2021).

A análise de variância (ANOVA), calculada a partir dos resultados experimentais, indicou um R^2 de 0,984, sendo a temperatura de fermentação, a concentração do extrato de levedura, o pH do meio sólido e a concentração de melaço de cana-de-açúcar, as únicas variáveis que apresentaram significância estatística ($p < 0,05$).

A análise de Pareto (Figura 15) permitiu verificar que, para a produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907, somente os fatores correspondentes à temperatura de fermentação, concentração de melaço de cana-de-açúcar e concentração de extrato de levedura, mostraram significância estatística positiva na atividade inulinase, permitindo um aumento da atividade enzimática nos níveis de 5,95; 5,39 e 4,63 U/g, respectivamente. Em contraste, o pH do meio sólido foi significativo, no entanto, um aumento no nível de pH no meio sólido significou uma diminuição na atividade enzimática (diminuição no nível de 5,47 U/g).

Figura 15 – Gráfica de Pareto para efeito padronizados na atividade inulinase da levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 com Planejamento Plackett-Burman



Fonte: Autoria própria (2021).

Os resultados obtidos mostram que a variação da temperatura entre 25 °C e 35 °C, produz um grande efeito sobre a produção de inulinase pela levedura *K. marxianus* ATCC 36907. As atividades enzimáticas máximas se obtêm quando a temperatura de incubação foi ajustado a 35 °C. No caso de enzimas extracelulares, a temperatura pode influenciar sua secreção, possivelmente alterando as propriedades físicas da membrana celular (EBRAHIMPOUR et al., 2011), como situação particular neste caso, a alta atividade enzimática em condições de alta temperatura pode ser devida ao fato das características termotolerantes que essa linhagem de leveduras apresenta, bem como a sua ampla capacidade de crescimento em condições de alta temperatura. (LANE et al., 2011).

A concentração de melaço de cana-de-açúcar também teve efeito significativo na produção de inulinase. Na experimentação, as atividades enzimáticas máximas foram encontradas usando concentrações de 50% p/p, é importante destacar que valores acima dessa concentração significaram uma diminuição na atividade enzimática, conforme é detalhado no item 5.4.1. Segundo Jain et al., (2012), a enzima inulinase geralmente apresenta caráter induzível, portanto sua síntese depende da concentração do substrato indutor fornecido, como é o caso da sacarose presente no melaço de cana-de-açúcar.

Da mesma forma, a concentração de extrato de levedura mostrou um efeito positivo significativo para a produção de inulinase. Os valores máximos de atividade foram detectados

usando concentrações de 0,05 g para cada 5 g de substrato sólido usado (resíduo cervejeiro). Resultados encontrados na literatura relataram que as melhores fontes de nitrogênio para a produção de inulinase são fontes complexas, por sobre as fontes inorgânicas, sendo o extrato de levedura considerado a melhor fonte de nitrogênio para a produção desse tipo de enzima (KANGO, 2008; JAIN; JAIN; KANGO, 2012).

A influência do pH inicial do meio sólido, pelo contrário, apesar de ser uma variável estatisticamente significativa ($p < 0,05$), influenciou negativamente na produção de inulinase quando foi utilizada em seu nível mais alto (pH de 7,5). A influência do pH no meio sólido é um parâmetro importante na produção enzimática, pois interfere diretamente na síntese e no crescimento celular. No presente trabalho, foi decidido manter o pH do meio em um valor fixo de 4,5, sendo este valor considerado favorável para a produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 (SCHNEIDER, 1996).

Dentro das faixas estudadas, as demais variáveis correspondentes a $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; K_2HPO_4 ; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; $\text{O ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e a ureia, tiveram efeito positivo, porém não exercem efeitos significativos ($p > 0,05$) nas respostas da atividade inulinase. Dessa forma, a combinação de variáveis (temperatura de fermentação, concentração de melão de cana e extrato de levedura), que tiveram influência positiva significativa na produção de inulinase, foram as variáveis escolhidas para um processo subsequente de otimização usando o Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR).

5.5 Otimização da produção de inulinase por DCCR

Para obter o melhor desempenho de atividade enzimática utilizando FES, os componentes do meio e as condições operacionais devem ser otimizados.

O planejamento Plackett-Burman, descrito no item 5.4, indicou que as variáveis correspondentes à temperatura de incubação, concentração de melão de cana-de-açúcar, concentração de extrato de levedura e pH do meio sólido exercem efeito significativo sobre a atividade da enzima inulinase produzida por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907. É importante argumentar que, embora a variável pH do meio sólido tenha significância estatística, optou-se por não a considerar no modelo de otimização já que exerceu um efeito negativo significativo, desta forma, o valor do pH foi mantido fixo em 4,5 para os testes subsequentes.

Os resultados do modelo de Plackett-Burman foram utilizados para um planejamento experimental 2^3 , para a otimização da produção de inulinase, utilizando a metodologia DCCR.

Para determinar os níveis ótimos na produção de inulinase, três fatores selecionados foram utilizados em diferentes intervalos de acordo com a Tabela 8. A Tabela 17 apresenta a matriz do desenho experimental que indica os valores codificados e reais usados em cada nível das variáveis independentes juntamente com a resposta experimental da atividade da enzima inulinase expressa em unidades enzimáticas U por grama de substrato usado (U/g).

A variação na atividade inulinase está compreendida entre uma faixa de 29,174 e 234,87 U/g, sendo observado um importante aumento da atividade enzimática em comparação com o planejamento Plackett-Burman. Em definitiva, este modelo foi utilizado a fim de obter um modelo quadrático capaz de descrever o comportamento da enzima produzida no meio de fermentação sólido em diferentes condições de temperatura de incubação, concentração de melaço e extrato de levedura. O modelo polinomial de segunda ordem, expresso pela Equação 23, no qual as variáveis (X_1 , X_2 e X_3), assumiram seus valores codificados, representa a atividade otimizada da inulinase.

$$\text{Atividade inulinase (U/g)} = 224.83 + 12.35x_1 - 58.2x_1^2 - 13.19x_2 - 24.27x_2^2 + 14.18x_3 - 22.35x_3^2 - 4.35x_1x_2 - 2.47x_1x_3 - 0.46x_2x_3 \quad (23)$$

Tabela 17 – Matriz do Planejamento experimental 2^3 para otimização da produção de inulinase pela levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 por FES utilizando o DCCR

Ensaio	Temperatura de incubação		Melaço de cana-de-açúcar		Extrato de levedura		Atividade Inulinase U/g
	X_1 (°C)	x_1	X_2 (% p/p)	x_2	X_3 (g)	x_3	
1	32	-1	40	-1	0,10	-1	109,12
2	32	-1	40	-1	0,20	1	132,47
3	32	-1	60	1	0,10	-1	95,56
4	32	-1	60	1	0,20	1	125,78
5	42	1	40	-1	0,10	-1	145,51
6	42	1	40	-1	0,20	1	167,68
7	42	1	60	1	0,10	-1	123,23
8	42	1	60	1	0,20	1	134,84
9	28,6	-1,682	50	0	0,15	0	29,17
10	45,4	1,682	50	0	0,15	0	65,06
11	37	0	33,2	-1,682	0,15	0	174,24
12	37	0	66,8	1,682	0,15	0	111,92

13	37	0	50	0	0,07	-1,682	116,89
14	37	0	50	0	0,23	1,682	180,12
15	37	0	50	0	0,15	0	234,87
16	37	0	50	0	0,15	0	222,45
17	37	0	50	0	0,15	0	221,68

Fonte: Autoria própria (2021).

A significância dos coeficientes das variáveis codificadas foi determinada pelos valores p e por meio do teste T de Student. Através dos resultados obtidos foi possível determinar os coeficientes de regressão que estão apresentados na Tabela 18, onde os termos lineares estão associados à letra L e os termos quadráticos à letra Q.

Tabela 18 – Coeficientes de regressão e significância do modelo de regressão para a resposta da atividade da inulinase.

Fator	Efeito	Erro Padrão	t(7)	p	Coeficiente	Erro Padrão
Interação	224,83	10,62	21,16	0,000	224,83	10,62
(1) Temperatura de incubação (L)	24,70	9,98	2,48	0,042	12,35	4,99
Temperatura de incubação (Q)	-116,40	10,98	-10,60	0,000	-58,20	5,49
(2) Melaço de cana-de-açúcar (L)	-26,39	9,98	-2,64	0,033	-13,19	4,99
Melaço de cana-de-açúcar (Q)	-48,54	10,98	-4,42	0,003	-24,27	5,49
(3) Extrato de levedura (L)	28,37	9,98	2,84	0,025	14,18	4,99
Extrato de levedura (Q)	-44,71	10,98	-4,07	0,005	-22,35	5,49
1L e 2L	-8,72	13,04	-0,67	0,525	-4,36	6,52
1L e 3L	-4,95	13,04	-0,38	0,716	-2,47	6,52
2L e 3L	-0,92	13,04	-0,07	0,946	-0,46	6,52

Fonte: Autoria própria (2021).

A análise de variância ANOVA (Tabela 19), cujo coeficiente de regressão foi verificado a um nível de significância (5%), foi realizada para a validação estatística do modelo polinomial que explica o comportamento da enzima inulinase, o Teste F e o coeficiente de determinação (R^2) foram utilizadas para esse propósito.

Tabela 19 – ANOVA do DCCR para o modelo de segunda ordem da atividade inulinase

Fator	SS	df	MS	F	p
(1) Temperatura de incubação (L)	2083,65	1	2083,65	38,0070	0,025316 ^a
Temperatura de incubação (Q)	38185,91	1	38185,91	696,5327	0,001433 ^a
(2) Melaço de cana-de-açúcar (L)	2376,99	1	2376,99	43,3576	0,022296 ^a
Melaço de cana-de-açúcar (Q)	6641,54	1	6641,54	121,1455	0,008154 ^a
(3) Extrato de levedura (L)	2747,17	1	2747,17	50,1099	0,019378 ^a
Extrato de levedura (Q)	5632,74	1	5632,74	102,7443	0,009593 ^a
1L e 2L	151,99	1	151,99	2,7724	0,237818
1L e 3L	48,96	1	48,96	0,8930	0,444419
2L e 3L	1,70	1	1,70	0,0310	0,876365
Falta de ajuste	2269,55	5	453,91	8,2796	0,111261 ^b
Erro puro	109,65	2	54,82		
Total SS	48758,31	16			

$R^2 = 0,951$ e R^2 ajustado = 0,888

$F_{\text{tab}}(9;7;0,05) = 3,677$; F do modelo = 15,16; Teste F p/Regressão: Inulinase: $F_{\text{modelo}}/F_{\text{Tab}} = 4,1$

SS: Soma dos quadrados; df: Graus de liberdade; MS: Quadrado médio

^a Valores significativos $p \leq 0,05$

^b Falta de ajuste não significativa

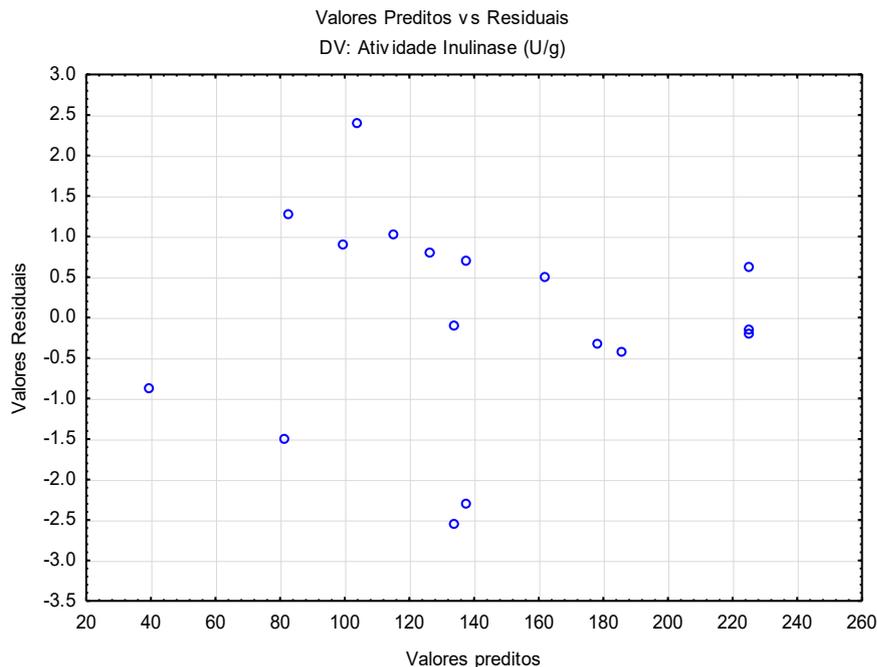
Fonte: Autoria própria (2021).

A análise de variância para o modelo de segunda ordem quanto à resposta da atividade da enzima inulinase indicou que todos os efeitos lineares e quadráticos foram significativos, ao contrário das interações entre as variáveis estudadas, as quais não foram significativas ($p > 0,05$). O maior valor de p ($1,4 \times 10^{-3}$) dos efeitos significativos foi o correspondente ao efeito quadrático da temperatura de incubação. A falta de ajuste neste modelo não foi significativa ($p = 1,11 \times 10^{-1}$), isso indica que o modelo reflete a real relação entre as variáveis concentração de melaço de cana, concentração de extrato de levedura e temperatura de incubação em resposta à atividade da inulinase. Além disso, o teste F para regressão resulta na relação $F_{\text{cal}}/F_{\text{Tab}}$ de 4,1 para a Inulinase o qual é elevado atestando a validade do modelo obtido (MONTGOMERY, 2012). De acordo com a análise do gráfico de resíduos vs valores preditos (Figura 16), pode-se observar a aleatoriedade desses resíduos em torno do zero, indicando uma distribuição normal, portanto, nenhuma transformação adicional é necessária na série de dados. O gráfico de probabilidade normal (Figura 17) mostra que os resíduos estão dentro do espectro de resíduos padronizados (-1,96 a +1,96) de uma distribuição normal (os pontos seguem uma linha reta). Isso indica a ausência de valores extremos ou *outliers* (o que significa uma observação com um resíduo "alto").

O R^2 do modelo foi de 0,951, ou aproximadamente 95,1% da variação observada na atividade da inulinase, pode ser explicado pelo modelo ajustado na Equação 23. Assim, a validade do modelo pode ser afirmada para explicar o comportamento da variável dependente. Por sua vez, também foi determinado o R^2 ajustado, cujo valor garante um ajuste satisfatório do modelo polinomial de segunda ordem aos dados avaliados na experimentação. O valor R^2 ajustado corrige o valor R^2 para o tamanho da amostra e o número de termos no modelo. O R^2 ajustado para a atividade da inulinase foi de 0,888, valor próximo ao R^2 do modelo.

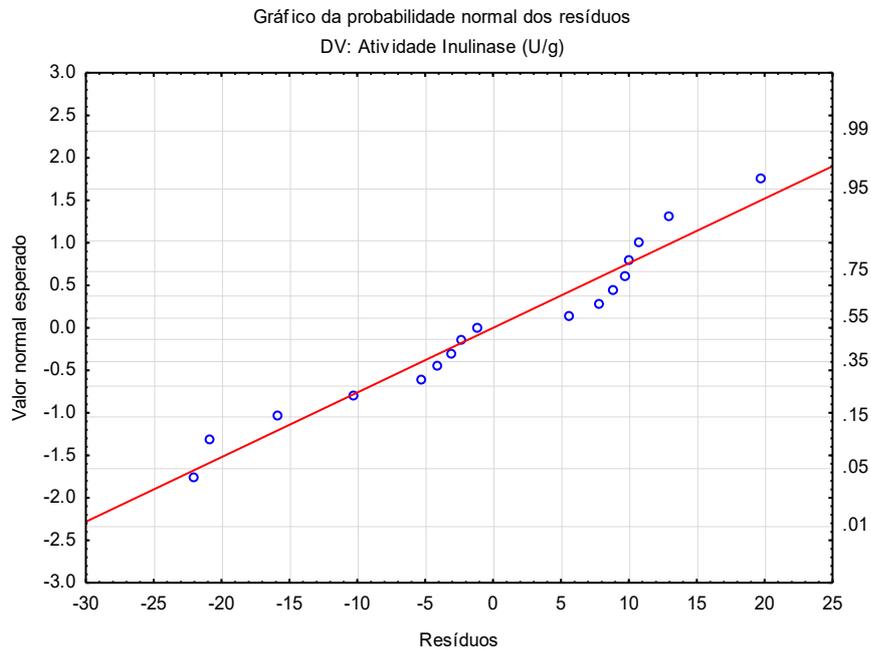
De acordo com a análise ANOVA, o modelo foi altamente significativo e, por meio da utilização de ferramentas como o cálculo do coeficiente de correlação (R^2), a confiabilidade do modelo foi confirmada. Portanto, foi possível construir gráficos de superfície de resposta e curvas de contorno da atividade da enzima inulinase em função das três variáveis independentes em estudo (Figuras 18 e 19).

Figura 16 – Gráfico dos resíduos vs valores preditos da atividade Inulinase do DCCR para a levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 ($\alpha = 0,05$)



Fonte: Autoria própria (2021).

Figura 17 – Gráfico da probabilidade normal dos resíduos da atividade Inulinase do DCCR para a levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 ($\alpha = 0,05$)

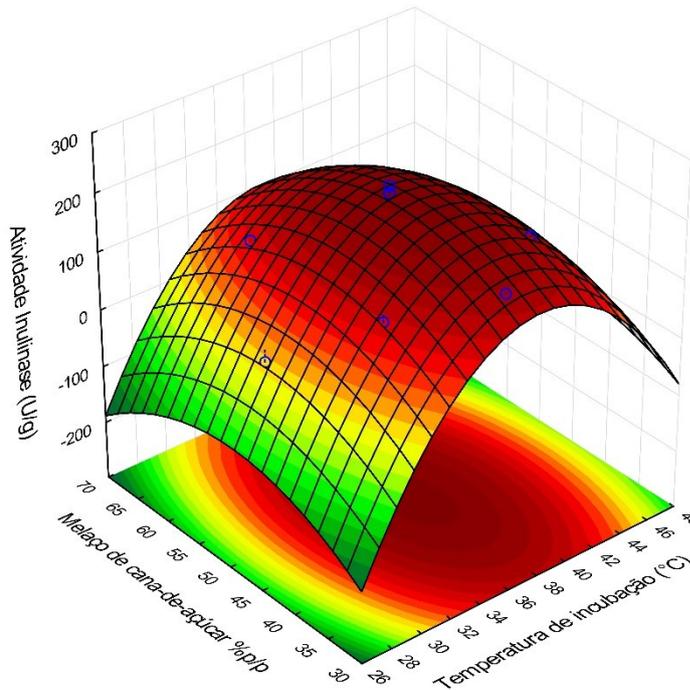


Fonte: Autoria própria (2021).

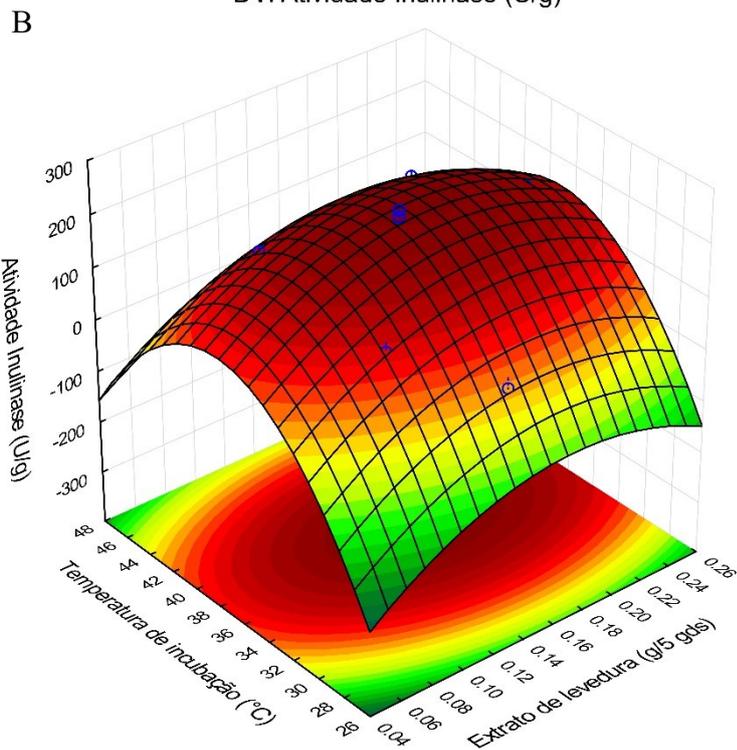
Os gráficos da superfície de resposta permitiram observar que as melhores condições para a atividade enzimática estão compreendidas na faixa entre 35-40 °C, para a temperatura de incubação; 45-50% p/p para a concentração de melaço de cana-de-açúcar e 0,15-0,18 g de extrato de levedura. De acordo com o modelo estatístico e os valores críticos de otimização, as condições ótimas para as variáveis independentes foram 37,55 °C de temperatura de incubação, 47,15% p/p de concentração de melaço de cana-de-açúcar e 0,16 g de extrato de levedura; esses parâmetros permitiram determinar um valor previsto para a atividade da inulinase de 229,61 U/g.

Figura 18 – Superfícies de resposta do DCCR para a atividade inulinase pela levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 em função de: (A) Melaço de cana e temperatura de incubação, (B) extrato de levedura e temperatura de incubação, (C) Melaço de cana e de extrato de levedura

A Superfície ajustada; Variável: Atividade Inulinase (U/g)
DV: Atividade Inulinase (U/g)

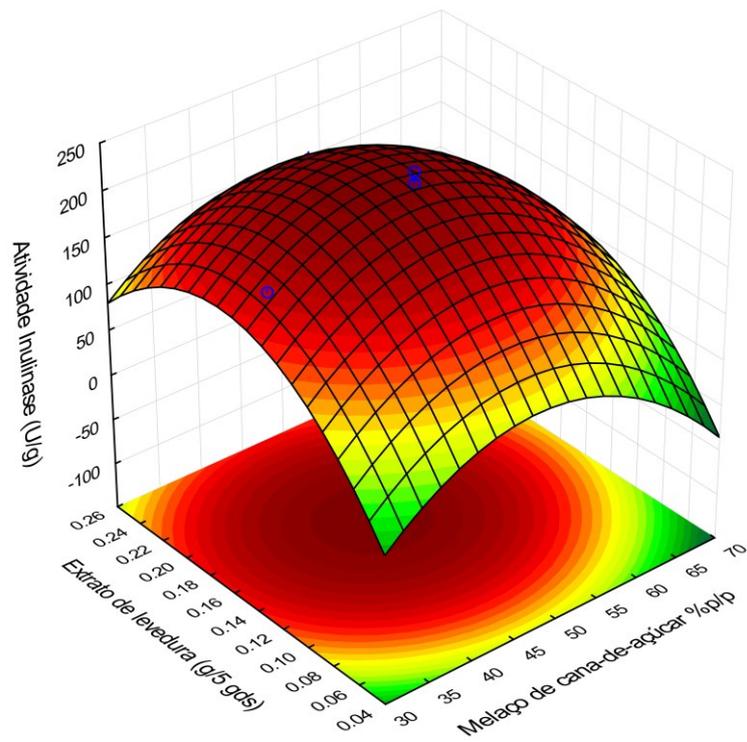


B Superfície ajustada; Variável: Atividade Inulinase (U/g)
DV: Atividade Inulinase (U/g)



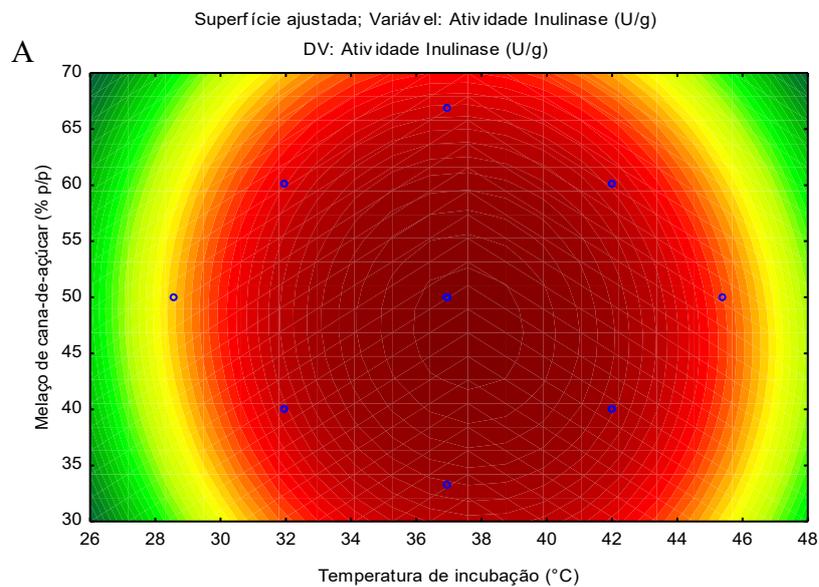
C

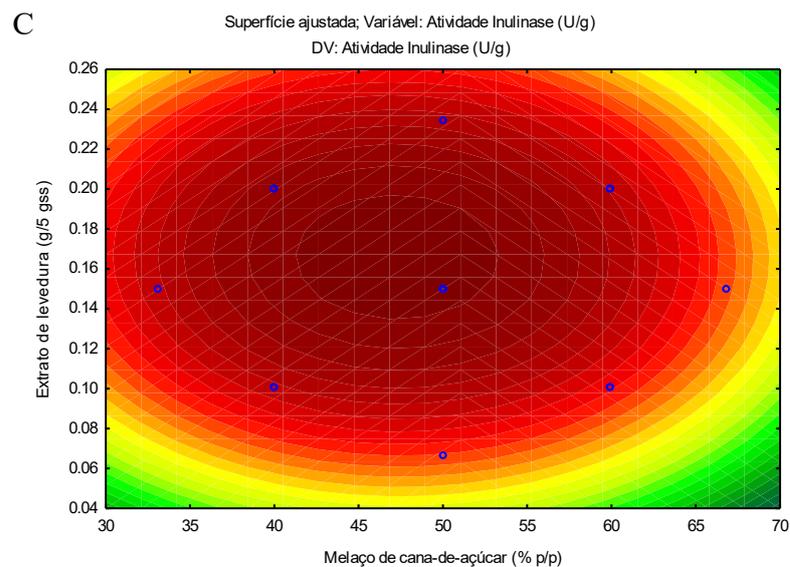
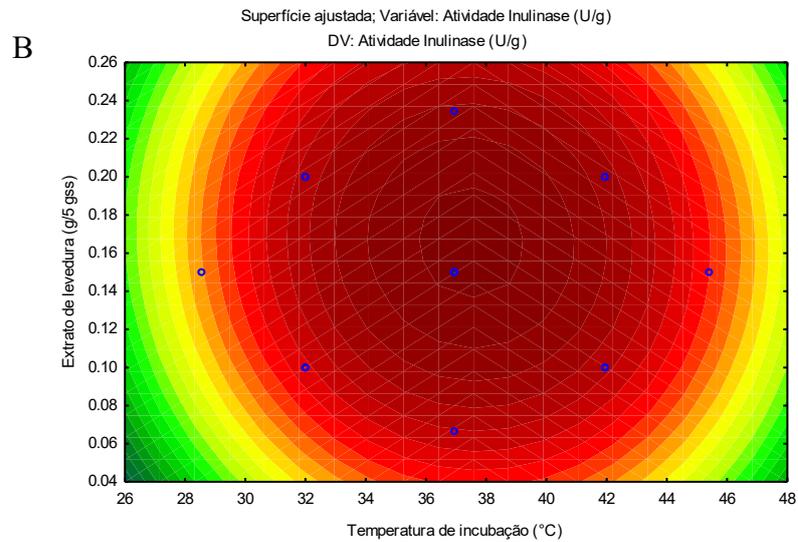
Superfície ajustada; Variável: Atividade Inulinase (U/g)
DV: Atividade Inulinase (U/g)



Fonte: Autoria própria (2021).

Figura 19 – Curvas de contorno do DCCR para a atividade inulinase pela levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 em função de: (A) Melaço de cana e temperatura de incubação, (B) extrato de levedura e temperatura de incubação, (C) Melaço de cana e de extrato de levedura





Fonte: Autoria própria (2021).

Na literatura existem vários estudos que desenvolvem modelos para a otimização da atividade da inulinase utilizando métodos, como o planejamento Box-Behnken (BB) e o delineamento composto central rotacional (DCCR), sendo ambos metodologias de superfície de resposta que incluem um conjunto de métodos empíricos que revela a relação entre as variáveis de entrada e saída (SIVAPATHASEKARAN; SEN, 2017), representadas por gráficos tridimensionais. As superfícies de resposta na Figura 18 mostraram que a atividade máxima é obtida na região localizada nos pontos centrais. A menor atividade enzimática na experimentação (29,174 U/g) foi obtida quando é utilizada uma temperatura de incubação de

28,6 °C, sendo esta a menor temperatura testada no modelo. Por outro lado, a maior atividade enzimática foi encontrada nas temperaturas entre 37 e 42 °C, correspondendo à temperatura ótima para o crescimento de *K. marxianus*. A alta temperatura para um crescimento ideal é particularmente interessante para aplicações comerciais, pois permite o resfriamento durante o processo de fermentação em larga escala, onde a transferência de calor é um fator limitante (KARIM; GERLIANI; AÏDER, 2020). A concentração de melão de cana-de-açúcar no meio sólido foi altamente significativa, apresentando-se como uma variável não proporcional ao aumento da atividade enzimática (efeito linear negativo), além disso, observou-se que seu efeito quadrático na atividade enzimática foi o segundo fator mais influente sobre as demais variáveis. Embora a menor concentração de melão de cana não seja a mais adequada para uma alta atividade da inulinase, tampouco são adequadas concentrações de melão de cana muito altas, portanto existe uma faixa de otimização. (Figura 18A). Diversos estudos têm apontado a importância do melão de cana-de-açúcar como complemento do meio de fermentação sólido para indução de enzimas inulinase (MAZUTTI et al., 2006; AYYACHAMY et al., 2007; TREICHEL et al., 2008; SGUAREZI et al., 2009; GOLUNSKI et al., 2017).

Do mesmo modo, o efeito na otimização da concentração do extrato de levedura apresentou um comportamento proporcional em relação ao aumento da atividade inulinase (efeito linear positivo), entretanto, esse efeito foi menos significativo do que o efeito quadrático dessa variável na resposta da atividade da inulinase. Concentrações de extrato de levedura superiores a 0,18 g para cada 5 g de substrato sólido, significou uma redução na atividade enzimática. Estudos indicam que utilizando fontes complexas de nitrogênio (extrato de levedura, extrato de carne, peptona) no meio, são obtidos melhores resultados da atividade inulinase de aproximadamente 5 vezes maior do que quando são utilizadas fontes de nitrogênio inorgânico (JAIN; JAIN; KANGO, 2012).

Gill (2003), embora considere o extrato de levedura como a melhor fonte de nitrogênio para a produção da inulinase, fontes inorgânicas como os sais de amônio diminuíram sua atividade; além disso, fontes orgânicas, como água de maceração de milho, são utilizadas como uma fonte rica de nitrogênio para a produção de enzimas (ABDULAMEER; ESSA; AZIZ, 2015).

5.6 Validação do modelo otimizado

A validação do modelo matemático e a cinética de produção enzimática foi avaliada nos pontos ótimos de operação determinados no planejamento DCCR especificados na Tabela

20. O valor experimental de atividade inulinase obtido na validação das condições otimizadas foi de 239,38 U/g, valor próximo ao previsto. Tal resultado validou o modelo proposto pela otimização das condições de fermentação em estado sólido utilizando o DCCR e foi possível verificar um aumento da atividade inulinase, sendo o valor otimizado 104,26% comparado com o valor predito e 101,92% comparado com o valor máximo obtido experimentalmente (Ponto Central).

Tabela 20 – Comparação de ensaio não otimizado e otimizado pelo DCCR

Ensaio	Temperatura de incubação (°C)	Concentração de melaço de cana-de-açúcar (% p/p)	Concentração de extrato de levedura (g)	Atividade Inulinase (U/g)	Relação S/I
Ponto Central	37	50	0,15	234,87	
Valor otimizado	37,5	47,1	0,16	239,38	10,18

Fonte: Autoria própria (2021).

Valores semelhantes de atividade inulinase foram encontrados por diferentes autores, Mazutti et al., (2007), trabalharam na produção de inulinase por fermentação em estado sólido do bagaço de cana-de-açúcar, utilizando planejamento fatorial para identificar o efeito de diferentes variáveis sobre atividade enzimática, como a concentração de licor de maceração de milho (CSL), concentração de farelo de soja, tamanho de partícula de bagaço e tamanho de inóculo. A atividade máxima de inulinase alcançada por este autor foi 250 U por g de substrato seco (gds) a 20% (p/p) de CSL, 5% (p/p) de farelo de soja, 1.10^{10} células/mL e tamanho de partícula do bagaço na faixa de malha 9/32.

Do mesmo modo, estudos realizados por Mazutti et al., (2006), foram desenvolvidos utilizando meio otimizado composto de bagaço de cana-de-açúcar e licor de milho fermentado, obtendo atividade máxima de inulinase de 391,9 U/g. Mazutti et al., (2010a), utilizando uma cepa de *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, indicaram uma atividade enzimática máxima de 463 U/g, da mesma forma que Astolfi et al., (2011), utilizando um biorreator de leito fixo em modo descontínuo e alimentado para a produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, relatou atividade inulinase máxima de 586 U/g, sendo este último valor a atividade inulinase mais alta relatada ao usar um meio sólido para fermentação.

Por outro lado, Singh et al., (2020), obtiveram atividade inulinase de 411,3 U/g utilizando a cepa de *Mucor circinelloides* em condições otimizadas de umidade, pH e tempo de fermentação; valores de atividade inulinase de 1,773 U/g de *Aspergillus parasiticus* foram

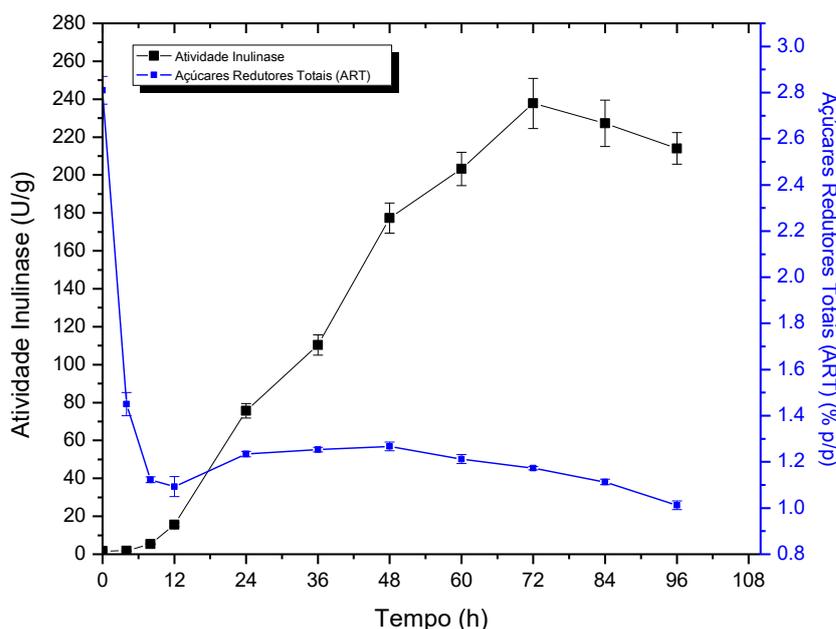
reportados quando foi utilizado bagaço de cana-de-açúcar e folhas de alcachofra (ABD EL ATY; WEHAIDY; MOSTAFA, 2014). Como pode ser observado, diferentes estudos relatam a atividade inulinase utilizando diferentes fontes de carbono, além de ser sintetizada por diferentes microrganismos. Todavia, devido às diferentes propriedades fisiológicas e bioquímicas do gênero *Kluyveromyces*, eles têm demonstrado até hoje, apresentar os melhores valores de atividade inulinase sobre os fungos filamentosos, sendo estes últimos considerados os melhores microrganismos adaptáveis às condições de fermentação em substrato sólido.

A relação da atividade em sacarose e inulina (S/I) também foi determinada na análise de validação. Essa proporção é um parâmetro importante porque mostra se a enzima é uma inulinase verdadeira ou uma invertase. A Tabela 20 mostra a relação S/I para o valor otimizado. Pode-se notar que a relação S/I foi de 10,181, valor menor que 100, o que caracteriza esta enzima como uma verdadeira inulinase. As relações na faixa de 9,5 a 77,2 foram relatadas na literatura (BURKERT et al., 2006).

5.7 Cinética da Produção enzimática na condição ótima

Na figura 20 é apresentada a cinética de produção enzimática a qual foi avaliada nos pontos ótimos de operação determinados no planejamento DCCR para a levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907, na fermentação em estado sólido foi considerado a cinética da fermentação até o tempo de 96h (4 dias).

Figura 20 – Cinética da FES da levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907. Perfis de Atividade enzimática Inulinase (U/g) e Açúcares Redutores Totais (ART)



Fonte: Autoria própria (2021).

Pode-se observar na Figura 20 que no tempo de 72 h se verifica o pico de produção da enzima com valor da atividade enzimática máxima, confirmando assim a validação do ponto ótimo. Observa-se também que a concentração dos açúcares redutores decresce ao longo da FES, como era esperado.

Os resultados mostram uma redução de 60% nos açúcares redutores totais (ART) nas primeiras 8h de fermentação, após a estabilização. A produção da enzima não é detectada antes das 8h de fermentação. O consumo total de açúcares durante a fermentação não foi observado, no entanto, na Figura 20 apresenta graficamente um ligeiro aumento na concentração de açúcares redutores totais chegadas às 24h.

Este último fato pode estar relacionado a dois fatores, o primeiro, a etapa de produção da enzima inulinase, hidrolisando a sacarose presente no meio sólido nos açúcares simples como glicose e frutose. A segunda opção está relacionada à ocorrência de hidrólise parcial da celulose durante a etapa de hidrólise da sacarose na determinação do açúcar redutor total. A celulose presente no RUC é um polímero de glicose ligado por ligações glicosídicas (1 → 4), que pode não ser facilmente acessível à levedura, mas ainda é quantificado por método analítico. Assim, o ART residual observado na Figura 20 pode ser o resultado desta hidrólise parcial da celulose durante a quantificação dos ART e não estava disponível para a levedura durante a fermentação.

A atividade enzimática máxima observada foi às 72 h de fermentação com uma produtividade estimada em 3,303 U/g.h, porém, sendo este parâmetro dependente do tempo de incubação, a produtividade máxima obtida na experimentação foi encontrada às 48 h (177,33 U/g de atividade inulinase), com um valor de 3,69 U/g.h.

A Tabela 21 apresenta uma análise comparativa das atividades enzimáticas obtidas no presente trabalho com aquelas reportadas na literatura, indicando que a produção de inulinase pela levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 apresenta uma boa produtividade e atividade enzimática com relação aos diferentes trabalhos baseados na produção desta enzima.

Tabela 21 – Comparação dos resultados obtidos de atividade enzimática e produtividade com enzimas inulinases produzidas por FES

Microrganismo	Atividade Enzimática (U/g)	Composição do meio sólido	Produtividade (U/g.h)	Referência
<i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 36907	239,381	RUC Melaço de cana-de-açúcar Extrato de levedura	3,69	Presente Trabalho
<i>Kluyveromyces marxianus</i> ATCC 52466	122,88	Farelo de trigo Farelo de arroz Resíduo de copra Farinha de milho	1,71	SELVAKUMAR e PANDEY, (1999)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571	391,9	Licor de maceração de milho Bagaço de cana	3,34	MAZUTTI et al., (2006)
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NRRL Y-7571	250,0	Farelo de soja Licor de maceração de milho Bagaço de cana	8,87	MAZUTTI et al., (2007)
<i>Streptomyces</i> sp. MTCC-3119	89,0	Extrato de levedura FeSO ₄ ·7H ₂ O NH ₄ NO ₃	0,927	DILIPKUMAR et al., (2011)
<i>P. rugulosum</i> MTCC-3487	239,0	Farinha de soja K ₂ HPO ₄ ZnSO ₂ ·7H ₂ O	4,97	DILIPKUMAR; et al, (2014)

Fonte: Autoria própria (2021).

5.8 Caracterização parcial da enzima inulinase

5.8.1 Determinação do pH ótimo e temperatura ótima

Conforme descrito no item 4.9.1, para a determinação dos valores de pH e temperatura ótima da enzima produzida em substrato sólido, foi realizado um DCCR 2², o qual foi composto por quatro pontos axiais, quatro fatoriais e quatro pontos centrais. A matriz do planejamento experimental em que as variáveis independentes em estudo são descritas, em sua forma real e codificada, bem como as atividades enzimáticas obtidas através da experimentação, estão

representadas na Tabela 22. É importante destacar que as atividades enzimáticas obtidas nos testes de caracterização enzimática foram expressas em U/mL (Unidade enzimática de atividade inulinase em função do volume do extrato). As medidas das atividades enzimáticas apresentadas na análise de caracterização são claramente inferiores aos resultados apresentados na otimização, isso devido a uma diluição do extrato enzimático (fator que não influencia no cálculo do pH e temperatura ótima da enzima extraída), podendo assim, realizar os cálculos dos testes enzimáticos a partir de um mesmo teste de extração.

Tabela 22 – Matriz do DCCR 2² na determinação da temperatura e o pH ótimo de reação em função da atividade inulinase.

Ensaio	Temperatura		pH		Atividade
	X ₁ (°C)	x ₁	X ₂	x ₂	Inulinase (U/mL)
1	50,0	-1	4,5	-1	12,58
2	50,0	-1	5,5	1	12,95
3	60,0	1	4,5	-1	10,76
4	60,0	1	5,5	1	10,32
5	47,9	-1,414	5,0	0	13,05
6	62,1	1,414	5,0	0	7,37
7	55,0	0	4,3	-1,414	13,60
8	55,0	0	5,7	1,414	11,81
9	55,0	0	5,0	0	15,26
10	55,0	0	5,0	0	16,28
11	55,0	0	5,0	0	16,11
12	55,0	0	5,0	0	15,33

Fonte: Autoria própria (2021).

A análise estatística dos dados apresentados na Tabela 22 resultou em um modelo empírico codificado que explica o comportamento das variáveis de pH e temperatura nos ensaios de atividade inulinase. Este modelo é útil para prever as condições de atividade da enzima inulinase na faixa estudada. Os parâmetros lineares das duas variáveis não apresentaram significância estatística, ao contrário dos parâmetros quadráticos para pH e temperatura, que foram estatisticamente significantes ($p < 0,05$). O modelo codificado para atividade da inulinase foi validado pela análise de variância (ANOVA), tabela 23. Obteve-se alto coeficiente de determinação ($R^2 = 0,95$) e bom desempenho do teste F para regressão.

Tabela 23 – Análise de variância (ANOVA) do DCCR na determinação da temperatura e o pH ótimo de reação em função da atividade inulinase

Fator	SS	dF	MS	F	p
(1) pH (L)	19,47	1	19,47	70,6	0,004 ^a
pH (Q)	47,30	1	47,30	171,6	0,001 ^a
(2) Temperatura (°C)(L)	0,84	1	0,84	3,1	0,179
Temperatura (°C)(Q)	13,83	1	13,83	50,2	0,006 ^a
1L e 2L	0,17	1	0,17	0,6	0,493
Falta de ajuste	2,44	3	0,81	2,9	0,199 ^b
Erro Puro	0,83	3	0,28		
Total SS	76,76	11			

$R^2 = 0,957$ e R^2 ajustado = 0,922

Valor F do modelo = 27,03

SS: Soma dos quadrados; df: Graus de liberdade; MS: Quadrado médio

^a Valores significativos $p < 0,05$

^b Falta de ajuste não significativa

Fonte: Autoria própria (2021).

A Equação 24, portanto, mostrou ser altamente preditiva em resposta à atividade inulinase na faixa de fatores investigados e consiste em uma função de segunda ordem de pH e temperatura. O modelo polinomial de segunda ordem, expresso pela Equação 24, as variáveis x_1 (Temperatura de reação) e x_2 (pH), assumiram seus valores codificados.

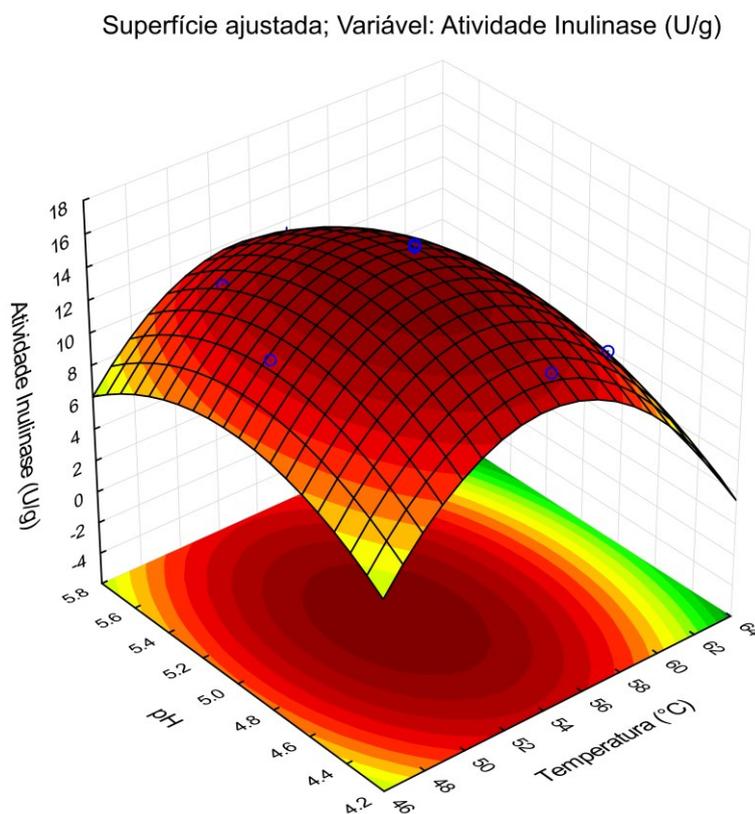
$$AE (U/mL) = 15,745 - 1,56x_1 - 2,71x_1^2 - 1,469x_2^2 \quad (24)$$

Observou-se que a maior atividade da enzima inulinase obtida foi encontrada no valor de pH 5,0 e temperatura de 55 °C, sendo essas variáveis localizadas nos pontos centrais do planejamento experimental. Em relação à temperatura dos testes enzimáticos, na Figura 22, no gráfico de contorno entre as variáveis de pH e temperatura, pode-se observar uma diminuição da atividade enzimática quando são utilizadas temperaturas acima de 55 °C, apresentando o menor valor de atividade inulinase quando foi utilizada uma temperatura de 62,07 °C. Segundo Silva et al., (2012a), a enzima inulinase produzida via fermentação sólida por *Aspergillus japonicus* URM5633, possui uma faixa de temperatura ótima de atividade entre 50 °C e 55 °C, por sua vez, Kushi et al., (2000) apresentam um resultado semelhante ao encontrado neste estudo, mostrando uma temperatura de hidrólise ideal para sacarose, rafinose e inulina em 55 °C, usando *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. Moriyama et al., (2002), estudaram a exo-inulinase de *Penicillium* sp. TN-88, também encontrando uma temperatura ótima de atividade de 55 °C. Em relação ao pH, a enzima inulinase apresentou um pH ótimo de 5,0. No

entanto, embora a atividade máxima tenha sido evidenciada utilizando essa condição de pH, a enzima também foi consideravelmente ativa entre uma faixa de pH entre 4,3-5,7 (Figura 22, pertencente à gráfica de contorno). De acordo com Sarup et al., (2007), as enzimas obtidas de diferentes fontes de substratos normalmente possuem um pH ótimo variável, possivelmente devido a diferentes composições de aminoácidos, que por sua vez afetam seu estado de ionização em uma solução. Portanto, uma enzima com uma ampla faixa de pH é sempre preferível para aplicação na indústria alimentícia.

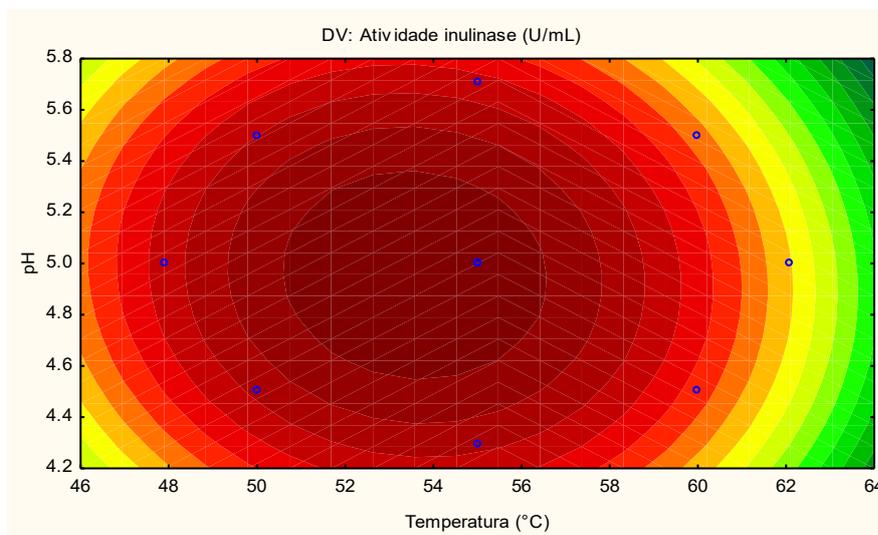
Com base na literatura relacionada ao pH e temperatura ótima da inulinase, pode-se concluir que não há diferença entre as faixas ótimas de pH que variam entre 4,5 e 7 nas leveduras produtoras desta enzima, ao contrário das faixas de temperatura, que apresentam variação entre uma faixa de 30 e 60 °C para a inulinase de fungos, enquanto as inulinasas bacterianas e de leveduras têm uma temperatura ideal entre 40 ° a 70 °C (SINGH; CHAUHAN; KENNEDY, 2017).

Figura 21 – Superfície de resposta do DCCR para a atividade inulinase pela levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 em função do pH e Temperatura



Fonte: Autoria própria (2021).

Figura 22 – Curvas de contorno para a atividade inulinase pela levedura *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907 em função do pH e a Temperatura.

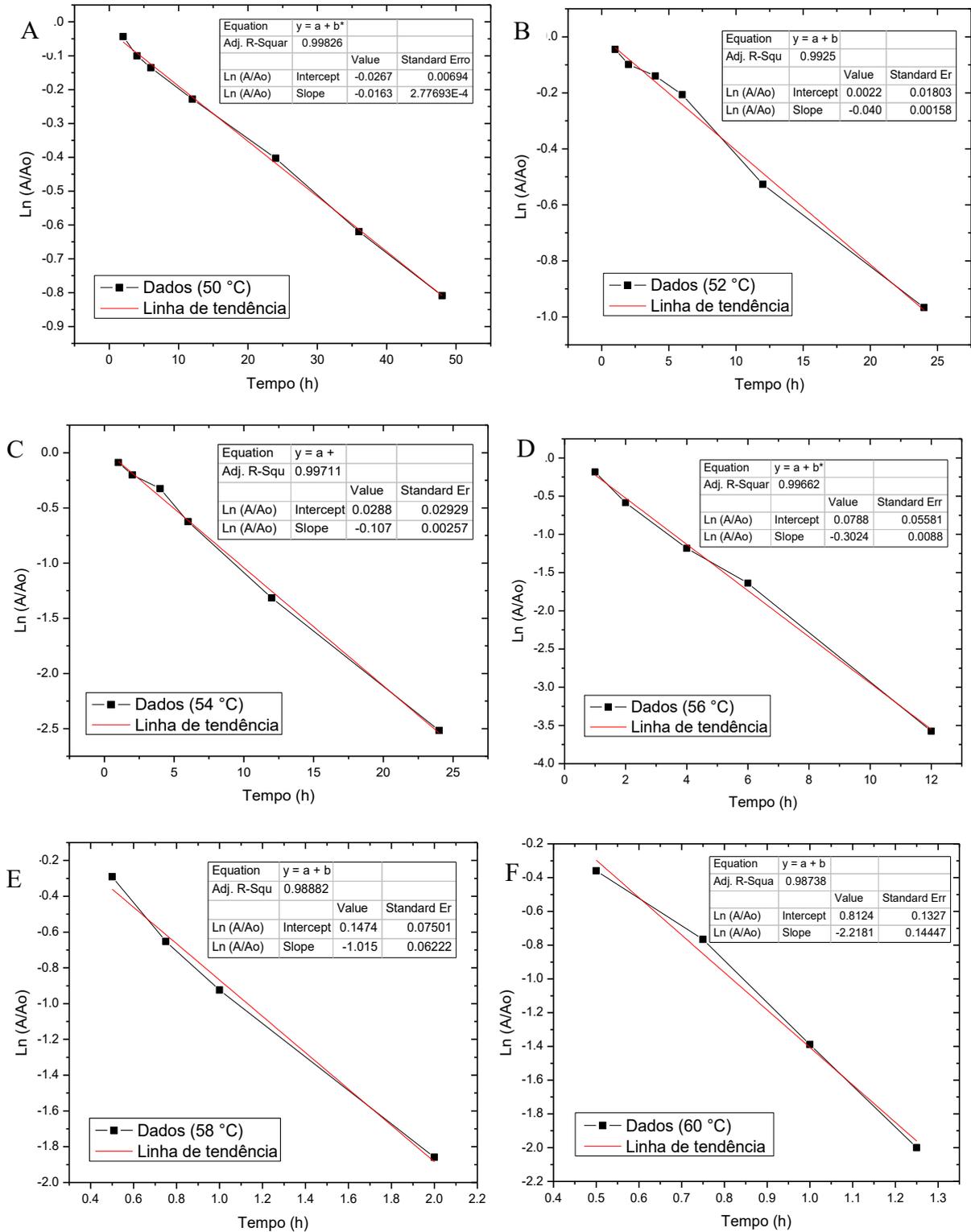


Fonte: Autoria própria (2021).

5.8.2 Temperatura de Estabilidade

A temperatura ótima de reação da enzima inulinase produzida por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907, foi encontrada na faixa entre 50 e 55 °C, nesta seção o efeito da temperatura foi avaliado em função do tempo de estabilidade, ampliando o intervalo de análise a 60 °C. A atividade da enzima foi diminuindo gradativamente com o aumento da temperatura, mostrando que a inativação térmica segue uma cinética de primeira ordem, como pode ser visto na Figura 23. A enzima inulinase, apresentou maior estabilização a uma temperatura de 50 °C, mantendo uma atividade residual próxima a 40% após 50 h de exposição. Mazutti et al., (2007), utilizando inulinase produzida em substrato sólido pela levedura *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, apresentou uma temperatura de maior estabilidade a 50 °C e da mesma forma uma menor, mas apreciável estabilidade térmica a 60 °C. Da mesma forma, Oliveira et al., (2016) utilizando a enzima inulinase produzida por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571 em xarope de Agave como substrato, também apresentou uma temperatura de maior estabilidade a 50 °C. Trapala et al., (2020), utilizando a enzima inulinase produzida por uma cepa de *Kluyveromyces marxianus* isolada de bagaço de agave azul, apresentou boa estabilidade térmica quando utilizadas temperaturas de 40 e 50 °C. Nesse sentido, pode-se afirmar que, existem relatos na literatura que mostram que as inulinases de *K. marxianus* são estáveis na faixa de temperatura de 40 e 60 °C, independente do meio de crescimento utilizado. Os dados obtidos experimentalmente de atividade enzimática na forma $\ln A/A_0$ vs tempo foram representados graficamente na Figura 23.

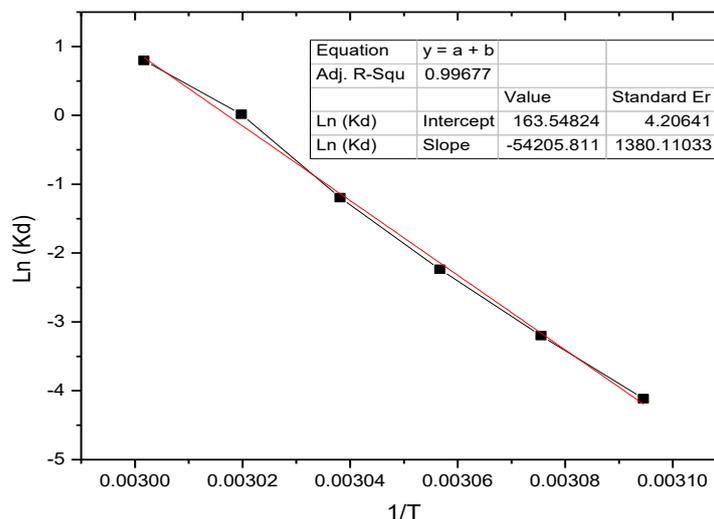
Figura 23 – Gráficos de regressão e ajuste linear das atividades enzimáticas em função do tempo para o cálculo das constantes de inativação térmica em diferentes temperaturas. (A) 50 °C; (B) 52 °C; (C) 54 °C; (D) 56 °C; (E) 58 °C e (F) 60 °C



Fonte: Autoria própria (2021).

Os gráficos de linha ajudaram a determinar o cálculo da constante de inativação K_d para cada temperatura. Os valores de K_d em função de $1/T$ (K) permitiram construir o gráfico de Arrhenius (Figura 24).

Figura 24 – Gráfico de Arrhenius e ajuste linear das constantes de inativação térmica em função da temperatura.



Fonte: Autoria própria (2021).

Para o cálculo da energia de desativação térmica (E_d) o qual foi de 450,7 kJ/mol. A Tabela 24 resume os parâmetros térmicos aparentes para a enzima, com relação à constante de velocidade K_d , os valores de D e a energia de desativação. Como é esperado, a constante de velocidade aumenta de 0,0163 para 2,22 h^{-1} com o aumento da temperatura de 50 para 60 °C. A 50 °C, a inulinase apresentou um valor D de 141,26 h^{-1} . O aumento de 4 °C na temperatura causa uma queda drástica no valor D (21,52 h^{-1}). Em temperaturas de 58 e 60 °C, a enzima apresenta menor estabilidade e os valores de D são 2,27 e 1,04 h^{-1} , respectivamente.

Tabela 24 – Resumo dos parâmetros de inativação térmica para inulinase produzida por *K. marxianus* ATCC 36907 por FES

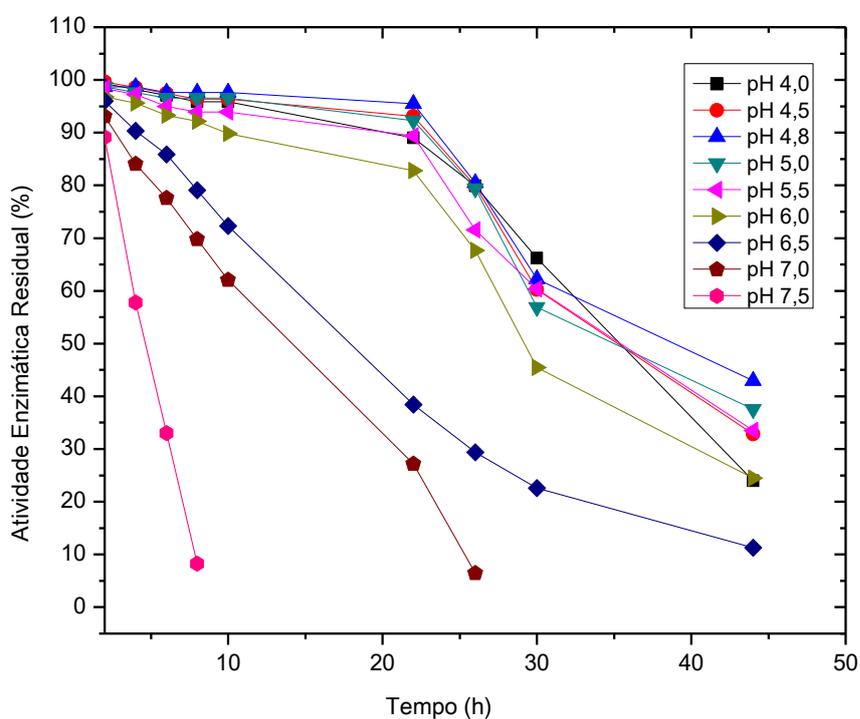
Temperatura (°C)	Constante de desativação térmica (K_d)	1/T (K)	Ln K_d	Valor-D
50	0,0163	0,00309	-4,11659	141,26
52	0,0408	0,00308	-3,19907	56,44
54	0,107	0,00306	-2,23493	21,52
56	0,3024	0,00304	-1,19600	7,61
58	1,0156	0,00302	0,01548	2,27
60	2,2182	0,00300	0,79670	1,04

Fonte: Autoria própria (2021).

5.8.3 pH de Estabilidade

A solução enzimática foi incubada em diferentes faixas de pH em diferentes intervalos de tempo (0-44 h). A Figura 25 apresenta a atividade residual da inulinase com pH variando de 4,0 a 5,5 em tampão de acetato de sódio 0,1 M, e pH entre 6,0 a 7,5 em tampão fosfato. Pode-se observar que a enzima se mostrou bastante estável na faixa de pH 4,0 a 6,0, onde reteve mais de 80% de sua atividade enzimática original após 22 h de incubação a 50 °C. Em pH 7,5; foi a reação com a menor estabilidade, após 2 h de incubação observa-se nítida redução de 42,22% da atividade enzimática, após 10 h de reação observa-se diminuição de 91,75%. Usando pH entre 6,5 e 7,0, pode ser observada uma ligeira estabilidade maior que 60% da atividade original da inulinase durante as primeiras 10 h de incubação, todavia, uma nítida diminuição também foi verificada às 10 h. A inulinase produzida no presente estudo tem faixas de pH semelhantes às relatadas por Schneider, (1996); Mazutti et al., (2007); Mazutti et al., (2010b) y Sarup; Dhaliwal; Puri, (2007).

Figura 25 – Influência do pH na estabilidade enzimática. Faixa de pH estudada entre 4,0 a 7,5. Os resultados são expressos em termos de atividade residual da enzima inulinase



Fonte: Autoria própria (2021).

5.8.4 Determinação das constantes de Michaelis-Menten (K_m e V_{max})

Foi investigado o efeito de diferentes concentrações de sacarose na faixa de concentração de 1 a 20 g/L sobre a atividade inulinase, os resultados experimentais foram plotados utilizando o método gráfico de Lineweaver-Burk, através da sua forma linearizada (Equação 25).

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{max}} * \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{max}} \quad (25)$$

A Tabela 25 mostra os valores experimentais das atividades enzimáticas para as diferentes concentrações de sacarose estudadas.

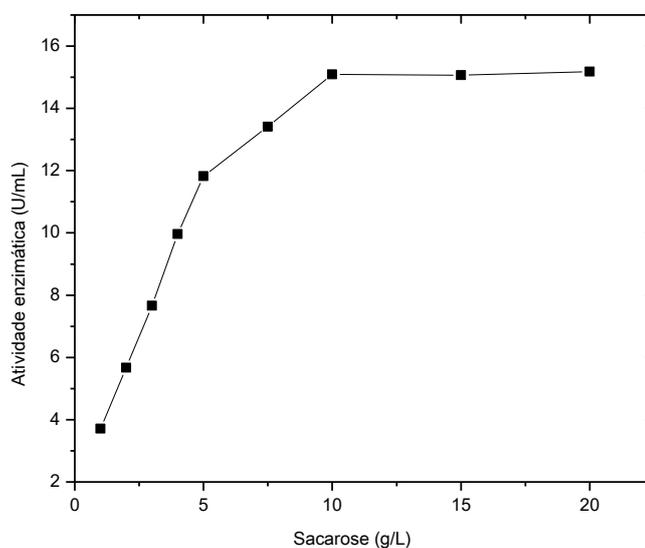
Tabela 25 – Atividade inulinase em função da concentração de sacarose

Sacarose	Atividade Enzimática	Sacarose	Atividade Enzimática	1/S	1/V
g/L	U/mL	mM	g/L.min	1/mM	L.min/g
1	2,36	2,921	0,6678	0,342	1,497
2	3,71	5,843	1,0206	0,171	0,980
3	5,67	8,764	1,3788	0,114	0,725
4	7,66	11,686	1,7928	0,086	0,558
5	9,96	14,607	2,1276	0,068	0,470
7.5	11,82	21,911	2,4138	0,046	0,414
10	13,41	29,214	2,7162	0,034	0,368
15	15,09	43,821	2,7126	0,023	0,369
20	15,07	58,428	2,7324	0,017	0,366

Fonte: Autoria própria (2021).

Na Figura 26 é apresentada a velocidade de reação enzimática em função da concentração de sacarose utilizando temperatura de 55 °C, o gráfico da velocidade foi realizado utilizando os dados especificados na Tabela 25.

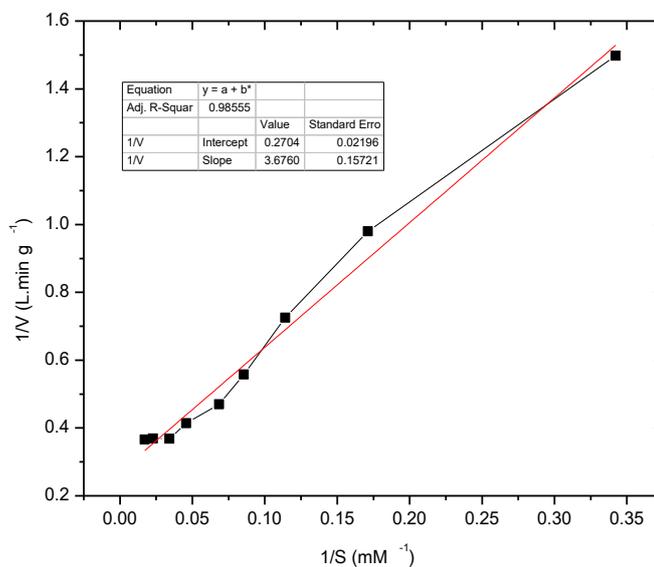
Figura 26 – Gráfica da Velocidade de reação enzimática em função da concentração de sacarose (Temperatura em 55 °C).



Fonte: Autoria própria (2021).

Os dados linearizados da velocidade de reação enzimática foram utilizados para calcular as constantes cinéticas por meio do Gráfico de Lineweaver-Burk representado na Figura 27.

Figura 27 – Gráfico de Lineweaver-Burk dos parâmetros linearizados de velocidade de reação e concentração de substrato para o cálculo das constantes cinéticas K_m e V_{max} .



Fonte: Autoria própria (2021).

O valor do K_m foi de 13,6 mM e o V_{max} foi de 3,69 g/L.min (0,02 M/min). O valor do K_m determinado neste trabalho foi superior aos encontrados em alguns relatos na literatura para

a hidrólise da sacarose. Mazutti et al., (2007), trabalhando com a enzima inulinase produzida por *Kluyveromyces marxianus* NRRL Y-7571, encontraram um valor de K_m de 7,1 mM e V_{max} de 17,79 M.min⁻¹. Da mesma forma, Arrizon et al., (2011), apresenta um valor de K_m de 29,1 mM utilizando sacarose como substrato, utilizando enzima purificada produzida por *Kluyveromyces marxianus* isolada durante a etapa de fermentação do processo de elaboração do Mezcal. Trapala (2020), por outro lado, utilizando enzima inulinase purificada produzida por uma cepa de *Kluyveromyces marxianus* isolada de Agave azul, apresentam um valor K_m superior de 97,3 mM para sacarose e 3,9 mM para inulina. Nesse sentido, pode-se afirmar que o K_m encontrado no presente trabalho está dentro da faixa da maioria das enzimas utilizadas industrialmente (0,01-100 mM) (GODFREY; WEST, 1996).

6 CONCLUSÕES

Este trabalho apresenta uma análise de otimização da produção de inulinase por fermentação em estado sólido de *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907, utilizando como principais o resíduo úmido cervejeiro (RUC) e melão de cana-de-açúcar.

Os resultados da caracterização química de ambos os substratos sugerem que são uma fonte propícia de nutrientes para a síntese enzimática, devido ao seu importante teor percentual de proteínas (RUC) e açúcares redutores e sacarose (melão de cana-de-açúcar).

As análises do tratamento mais adequado para o melão de cana-de-açúcar (100 g/L) mostram que o tratamento com ácido sulfúrico 1 M ajustando o pH inicial em 5,0 e o pH final em 4,0, foi o mais propiciado para favorecer o aumento da atividade enzimática e por sua vez beneficiar o crescimento microbiano.

Os testes preliminares de fermentação serviram para conhecer variáveis fixas de trabalho que se mantiveram constantes durante o desenvolvimento da fase experimental. Determinou-se que a atividade enzimática máxima foi encontrada às 72h de fermentação em meio sólido composto por 75% de umidade inicial.

No âmbito da avaliação dos parâmetros físicos e nutricionais do meio de cultura sólido, foram definidas como as variáveis mais significativas, a concentração de melão de cana-de-açúcar, a temperatura de incubação e a concentração de extrato de levedura, variáveis que foram utilizadas nos testes de otimização.

De acordo com os resultados da análise de otimização, foi possível obter uma atividade enzimática máxima de 239,38 U/g, utilizando as condições otimizadas para temperatura de

incubação de 37,5 °C, concentração de melaço-de-cana em 47,1% p/p e 0,16 g de extrato de levedura por cada 5 g de resíduo cervejeiro seco utilizado. Os valores experimentais e previstos de atividade da inulinase foram relativamente próximos, indicando um bom ajuste do modelo estabelecido. Por outro lado, a produtividade máxima obtida foi de 3,69 U/g.h, apresentando-se superior a alguns trabalhos relatados na literatura.

Com relação à caracterização parcial da enzima, conclui-se que a temperatura e o pH para a atividade máxima da enzima inulinase são 5,0 e 55 °C, respectivamente. A enzima apresentou maior estabilidade a 50 °C, diminuindo gradativamente com o seu aumento. O tempo de redução decimal ou valor-D foi de 141,26 h⁻¹ a uma temperatura de 50 °C e a energia de desativação aparente de 450,7 kJ/mol. Do mesmo modo, a enzima apresentou uma boa estabilidade em uma ampla faixa de pH (4,0-6,0), mantendo sua atividade residual até um 80% durante 22h. Em relação aos parâmetros aparentes de Michaelis-Menten K_m e V_{max} para a hidrólise da sacarose foram 13,6 mM e 3.69 g/L.min, respectivamente.

Assim, este estudo atendeu o objetivo geral pois foi possível obter elevada atividade e produtividade enzimática, aproveitando a composição nutritiva dos resíduos agroindustriais como o RUC e o melaço de cana-de-açúcar em fermentações sólidas catalisada por leveduras.

A partir dos dados apresentados neste trabalho contrastando com os resultados já existentes na literatura, verifica-se o grande potencial de substratos agroindustriais com alta disponibilidade e baixo custo, para sua utilização em fermentações sólidas a fim de produzir enzimas de interesse industrial.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Os seguintes itens são sugeridos visando a complementação deste trabalho:

- Estudo da seleção de outros resíduos agroindustriais como fonte de nitrogênio para a maximização da atividade inulinase.
- Estudo da purificação enzimática para análise de caracterização.
- Modelagem e simulação da cinética da hidrólise enzimática e o crescimento da levedura.
- Otimização da produção de inulinase em fermentador.

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, 15 fev. 2014.
- ABDULAMEER, Z.; ESSA, B.; AZIZ. Optimum conditions for Inulinase production by *Aspergillus niger* using solid state fermentation. **Baghdad Science Journal**, v. 12, n. 2, p. 307–316, 7 jun. 2015.
- AL-DABBAGH, Y.; A. MAHMOOD, W. Effect of Carbon, Nitrogen and pH on Inulinase Production from Local Isolate of *Aspergillus niger*. **Zanco Journal of Pure and Applied Sciences**, v. 27, n. 3, p. 1–8, 1 abr. 2015.
- AL-DAGAL, M. M. (KING S. U.; BAZARAA, W. A. Synthesis and properties of extracellular inulinase of *Kluyveromyces marxianus* strains NRRL 2415 and ATCC 8601. **Egyptian Journal of Microbiology (Egypt)**, 1998.
- ALI, M. K.; HILIGSMANN, S.; CHAOUICHE, N. K. **Production of inulinase by Pichia caribbica using artichoke extract and pure chicory Inulin**. 2016
- ANG, S. K. et al. Production of cellulases and xylanase by *Aspergillus fumigatus* SK1 using untreated oil palm trunk through solid-state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 48, n. 9, p. 1293–1302, 1 set. 2013.
- AOAC: Official Methods of Analysis (Volume 1). v. 1, p. 771, 1990.
- APOLINÁRIO, A. C. et al. Inulin-type fructans: a review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 368–378, 30 jan. 2014.
- ARAÚJO, L. M. D. **Avaliação Físico-Química de melão e melado**. Trabalho de conclusão de curso (Curso de Tecnologia em Produção Sucroalcooleira) – Universidade Federal de Paraíba, Paraíba, 2017.
- 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.
- ASCHERI, D. P. R. et al. Curvas de secagem e caracterização de hidrolisados de bagaço de cevada. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 47., 2007. Lagoa Nova - RN. **Anais [...]**. Rio Grande do Norte: Associação Brasileira de Química, 2007. Tema: Recursos não renováveis. Disponível em: <<http://www.abq.org.br/cbq/2007/trabalhos/10/10-380-261.htm>>. Acesso em: 28 jul. 2020.
- ASHRAF, S.; ALI, S. Pre-Treatment of Raw Sugarcane Molasses by Metal Complexing Agents for Improved Citric Acid Fermentation by *Aspergillus Niger*. **International Journal of Research in Pharmacy and Biosciences**, v. 2, n. 6, p. 34-40, 2015.

- ASTOLFI, V. et al. Operation of a fixed-bed bioreactor in batch and fed-batch modes for production of inulinase by solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 58–59, p. 39–49, 15 dez. 2011.
- ATY, A. A. A. E.; WEHAIDY, H. R.; MOSTAFA, F. S. A. Optimization of inulinase production from low cost substrates using Plackett-Burman and Taguchi methods. **Carbohydrate polymers**, v. 102, p. 261–268, 2014.
- AYYACHAMY, M. et al. Production of inulinase by *Xanthomonas campestris* pv *phaseoli* using onion (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*) peels in solid state cultivation. **Letters in Applied Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 439–444, out. 2007.
- BRAHMACHARI, G. **Biotechnology of Microbial Enzymes**. Elsevier, 2017.
- BROWNING, B. L. **Methods of wood chemistry**. New York: Interscience Publishers, 1967.
- BURKERT, J. F. M. et al. Parameters optimization for enzymatic assays using experimental design. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 23, n. 2, p. 163–170, jun. 2006.
- CANLI, O.; KURBANOGLU, E. B. Application of low magnetic field on inulinase production by *Geotrichum candidum* under solid-state fermentation using leek as substrate. **Toxicology and Industrial Health**, v. 28, n. 10, p. 894–900, nov. 2012.
- CARDOSO, T. DE F. et al. Technical and economic assessment of trash recovery in the sugarcane bioenergy production system. **Scientia Agricola**, v. 70, n. 5, p. 353–360, out. 2013.
- CARVALHO, S. et al. Resíduo úmido de cervejaria na terminação de cordeiros em confinamento e seus efeitos sobre as características da carcaça e dos componentes não carcaça. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 3, p. 742–750, jun. 2017.
- CAZETTA, M. L.; MONTI, R.; CONTIERO, J. Effects of culture conditions on the production of inulinase by *Kluyveromyces marxianus*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 3, p. 701–707, jun. 2010.
- CERVBRASIL. **Mercado Cervejeiro- Anuário 2016**. Disponível em: <http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/anuarios/CervBrasil-Anuario2016_WEB.pdf>. Acesso em: 14 abr. 2019.
- CHEN, H. **Modern Solid State Fermentation: Theory and Practice**. Springer Netherlands, 2013.
- CORDEIRO, L. G. **Caracterização e Viabilidade econômica do Bagaço de malte oriundo de cervejarias para fins energéticos**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Paraíba, João Pessoa, 2011.
- DAS, D.; BHAT M, R.; SELVARAJ, R. Review of inulinase production using solid-state fermentation. **Annals of Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 201–209, 1 mar. 2019.

DELABONA, P. S. et al. Using Amazon forest fungi and agricultural residues as a strategy to produce cellulolytic enzymes. **Biomass and Bioenergy**, v. 37, p. 243–250, 1 fev. 2012.

DIAS, M. O. DE S. et al. Sugarcane processing for ethanol and sugar in Brazil. **Environmental Development**, v. 15, p. 35–51, jul. 2015.

DILIPKUMAR, M.; RAJASIMMAN, M.; RAJAMOCHAN, N. Application of statistical design for the production of inulinase by *Streptomyces sp.* using pressmud. **Frontiers of Chemical Science and Engineering**, v. 5, n. 4, p. 463–470, dez. 2011.

DILIPKUMAR, M.; RAJASIMMAN, M.; RAJAMOCHAN, N. Utilization of copra waste for the solid-state fermentative production of inulinase in batch and packed bed reactors. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p. 662–668, fev. 2014.

DRAGONE, S. I. M. **Aproveitamento integral de subproduto da indústria cervejeira em processos químicos e biotecnológicos**. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial) – Universidade de São Paulo, Lorena, 2007.

EBRAHIMPOUR, A. et al. Lipase production and growth modeling of a novel thermophilic bacterium: *Aneurinibacillus thermoaerophilus* strain AFNA. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 6–6, jul. 2011.

ERDAL, S.; CANLI, O.; ALGUR, O. F. Inulinase production by *Geotrichum candidum* using Jerusalem artichoke as sole carbon source. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 16, n. 4, p. 6, 2011.

ETTALIBI, M.; BARATTI, J. C. Purification, properties and comparison of invertase, exoinulinases and endoinulinases of *Aspergillus ficuum*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 1, p. 13–20, 1 abr. 1987.

FAGUNDES, A. D. R. **Características Nutricionais com ênfase no Ferro e Capacidade antioxidante de Melados produzidos em Santa Catarina**. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

FAJARDO, E. E. F.; SARMIENTO, S. C. S. **Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae***. Tesis (Título de Microbiólogo Industrial) – Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, 2007.

FĂRCAȘ, A. C. et al. Volatile profile, fatty acids composition and total phenolics content of brewers' spent grain by-product with potential use in the development of new functional foods. **Journal of Cereal Science**, v. 64, p. 34–42, 1 jul. 2015.

FAWZI, E. M. Comparative study of two purified inulinases from thermophile *Thielavia Terrestris* NRRL 8126 and mesophile *Aspergillus Foetidus* NRRL 337 grown on *Cichorium Intybus* l. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 633–649, jun. 2011.

FEDNA. **Bagazo de cerveza húmedo** | FEDNA. Disponível em:

<http://www.fundacionfedna.org/subproductos_fibrosos_humedos/bagazo-de-cerveza-h%C3%BAmedo>. Acesso em: 15 abr. 2019.

FELTRIN, V. P. et al. Produção de *Lactobacillus plantarum* em melaço de cana-de-açúcar. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, n. 1, p. 0–0, 2000.

FLEMING, S. E.; GROOTWASSINK, J. W. Preparation of high-fructose syrup from the tubers of the Jerusalem artichoke *Helianthus tuberosus* L. **CRC critical reviews in food science and nutrition**, v. 12, n. 1, p. 1–28, nov. 1979.

FONSECA, G. G. et al. The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 79, n. 3, p. 339–354, 1 jun. 2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION (EDS.). **Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation**. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations : World Health Organization, 2006.

GILL, P. Effect of media supplements and culture conditions on inulinase production by an actinomycete strain. **Bioresource Technology**, v. 87, n. 3, p. 359–362, maio 2003.

GODFREY, T.; WEST, S. **Industrial enzymology**. London: Macmillan, 1996.

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, p. 57–63, 1 mar. 2017.

GOTTHARDI, A. et al. Aproveitamento do bagaço de malte no desenvolvimento de pão de mel. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE TECNOLOGIAS PARA O MEIO AMBIENTE, 6., 2018. Bento Gonçalves – RS. **Anais [...]**. Rio Grande do Sul: Universidade de Caxias do Sul, 2018. Disponível em: <https://siambiental.ucs.br/congresso/getArtigo.php?id=613&ano=_sexto>. Acesso em: 31 jul. 2020

GUO, N. et al. Enhanced inulinase production in solid-state fermentation by a mutant of the marine yeast *Pichia guilliermondii* using surface response methodology and inulin hydrolysis. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 36, n. 4, p. 499–507, abr. 2009.

HAWASHI, M.; WIDJAJA, T.; GUNAWAN, S. Solid-State Fermentation of Cassava Products for Degradation of Anti-Nutritional Value and Enrichment of Nutritional Value. **New Advances on Fermentation Processes**, jun. 2019.

HERRERA, E. et al. Protein enrichment of *Opuntia ficus-indica* using *Kluyveromyces marxianus* in solid-state fermentation. **Ciencia e investigación agraria**, v. 44, n. 2, p. 113–120, 2017.

HOUSSEINY, M. M. Production of an endoinulinase from *Aspergillus niger* AUMC 9375, by solid-state fermentation of agricultural wastes, with purification and characterization of the free and immobilized enzyme. **Journal of Microbiology (Seoul, Korea)**, v. 52, n. 5, p. 389–398, maio 2014.

IRICK, T. J. et al. Comparison of colorimetric and HPLC techniques for quantitating the carbohydrate components of steam-treated wood: Scientific note. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 17, n. 1–3, p. 137–149, abr. 1988.

IRYANI, D. et al. Overview of Indonesian sugarcane industry and utilization of its solid waste. In: **THE ANNUAL FALL MEETING OF THE MINING AND MATERIALS PROCESSING INSTITUTE OF JAPAN (MMIJ)**, 2012. Disponível em: <<https://confit.atlas.jp/guide/organizer/mmij/events>>. Acesso em: 15 set. 2020

ISMAIL ALI SABER, W.; EL-NAGGAR, N. Optimization of Fermentation Conditions for the Biosynthesis of Inulinase by the New Source; *Aspergillus tamaris* and Hydrolysis of Some Inulin Containing Agro-Wastes. **Biotechnology**, v. 8, 1 abr. 2009.

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, 2012a.

JIANG, L. et al. Fermentative hydrogen production from Jerusalem artichoke by *Clostridium tyrobutyricum* expressing exo-inulinase gene. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 7940, 11 ago. 2017.

JOSEPH, R.; BACHHAWAT, A. K. Yeasts: Production and Commercial Uses. In: BATT, C. A.; TORTORELLO, M. L. (Eds.). **Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)**. Oxford: Academic Press, 2014. p. 823–830.

KABKE, K. C. P. **Otimização da produção de inulinase em meio industrial através de linhagens de *Kluyveromyces marxianus***. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

KANAUCHI, O.; MITSUYAMA, K.; ARAKI, Y. Development of a Functional Germinated Barley Foodstuff from Brewer's Spent Grain for the Treatment of Ulcerative Colitis. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**, v. 59, n. 2, p. 59–62, 2001.

KANGO, N. Production of inulinase using tap roots of dandelion (*Taraxacum officinale*) by *Aspergillus niger*. **Journal of Food Engineering**, v. 85, n. 3, p. 473–478, 1 abr. 2008.

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

KARATOP, R.; SANAL, F. A Potential Resource in Fructose Production from Inulin: *Aspergillus wentii* Inulinase. **Journal of Cell and Molecular Biology**, v. 11, p. 21–28, 2 nov. 2013.

KARIM, A.; GERLIANI, N.; AİDER, M. *Kluyveromyces marxianus*: An emerging yeast cell factory for applications in food and biotechnology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 333, p. 108818, nov. 2020.

KARLAPUDI, A. P. et al. Plackett-Burman design for screening of process components and their effects on production of lactase by newly isolated *Bacillus* sp. VUVD101 strain from Dairy effluent. **Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 7, n. 4, p. 543–546, 1 dez. 2018.

KAYS, S.; NOTTINGHAM, S. F. Chemical composition and inulin chemistry. **Biology and chemistry of Jerusalem artichoke: Helianthus tuberosus L**, p. 53–96, 1 jan. 2007.

KENDALL, N. T. Barley and malt. In: **Handbook of Brewing**. CRC Press, 1994. p. 109–120.

KUSHI, R. T.; MONTI, R.; CONTIERO, J. Production, purification and characterization of an extracellular inulinase from *Kluyveromyces marxianus* var. *bulgaricus*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 2, p. 63–69, 1 ago. 2000.

LANE, M. M. et al. Physiological and metabolic diversity in the yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 100, n. 4, p. 507–519, nov. 2011.

LENSE, K.; SCHMIDT, H. **Katechismus der Brauerei-Praxis : ein Frage- und Antwortbuch für die grundlegende Ausbildung im Braugewerbe sowie zur Verwendung bei Meister- und Gesellen-Prüfungen**. Nürnberg : Carl, Getränke-Fachverl., 1989. v. 15

LINKO, M. et al. Recent advances in the malting and brewing industry 1 Based on a lecture held at the symposium 'Biotechnology in advanced food and feed processing', at the 8th European Congress on Biotechnology (ECB8) in Budapest, Hungary, August 1997.1. **Journal of Biotechnology**, v. 65, n. 2, p. 85–98, 27 out. 1998.

LIU, H.-Q. et al. Evaluation of cellulases produced from four fungi cultured on furfural residues and microcrystalline cellulose. **Biodegradation**, v. 23, n. 3, p. 465–472, jun. 2012.

LUKONDEH, T.; ASHBOLT, N. J.; ROGERS, P. L. Fed-batch fermentation for production of *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 cultivated on a lactose-based medium. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 32, n. 7, p. 284–288, jul. 2005.

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. et al. Production of inulinase by solid-state fermentation: effect of process parameters on production and preliminary characterization of enzyme preparations. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 30, n. 5, p. 297–304, set. 2007.

MAZUTTI, M. et al. Kinetics of inulinase production by solid-state fermentation in a packed-bed bioreactor. **Food Chemistry**, v. 120, p. 163–173, 1 maio 2010a.

MAZUTTI, M. A. et al. Inulinase production in a batch bioreactor using agroindustrial residues as the substrate: experimental data and modeling. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 32, n. 1, p. 85–95, 1 jan. 2009.

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, 2010b.

MELAÇOS BRASILEIROS. **Especificações técnicas do melaço**, 2020. Disponível em: <<https://melacos.com.br/especificacoes-tecnicas>>. Acesso em: 24 jul. 2020

MELLO, V. **Determinação da composição do bagaço do malte de cevada e estudo das suas potenciais aplicações**. Monografia (Curso de Engenharia Química) – Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

MEYER, D.; BLAAUWHOED, J.-P. Inulin. In: PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. (Eds.). **Handbook of Hydrocolloids (Second Edition)**. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead Publishing, 2009. p. 829–848.

MONTGOMERY, D. C. **Design and Analysis of Experiments**. Hoboken, NJ. 2012.

MORIYAMA, S. et al. Purification and Properties of an Extracellular Exoinulinase from *Penicillium* sp. Strain TN-88 and Sequence Analysis of the Encoding Gene. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 66, n. 9, p. 1887–1896, 1 jan. 2002.

MUSLIM, S. et al. Detection of the optimal conditions for inulinase productivity and activity by *Acinetobacter baumannii* isolated from agricultural rhizosphere soil. **Int'l Journal of Advances in Chemical Engg., & Biological Sciences**, v. 2, n. 1, 2015.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I. C. Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. **Journal of Cereal Science**, v. 43, n. 1, p. 1–14, 1 jan. 2006.

MUSSATTO, S. I.; ROBERTO, I. C. Acid hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain to produce xylitol. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 85, n. 14, p. 2453–2460, 2005.

NARAYANAN, M. et al. Studies on the Optimization and Characterization for the Biosynthesis of Inulinase under Solid-state Fermentation. **International Journal of ChemTech Research**, v. 5, n. 1, p. 9, 2013.

NEAGU, C.; BAHRIM, G. Inulinases-a versatile tool for biotechnology. **Innovative Romanian Food Biotechnology**, v. 9, p. 1–11, 1 jan. 2011.

NIEMI, P. et al. Characterization of Lipids and Lignans in Brewer's Spent Grain and Its Enzymatically Extracted Fraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 39, p. 9910–9917, 3 out. 2012.

ODA, Y.; NAKAMURA, K. Production of ethanol from the mixture of beet molasses and cheese whey by a 2-deoxyglucose-resistant mutant of *Kluyveromyces marxianus*. **FEMS yeast research**, v. 9, n. 5, p. 742–748, ago. 2009.

OLIVEIRA, C. A. DE. **Digestão anaeróbia termofílica do melão de cana-de-açúcar em reatores de leito fixo estruturado de duas fases e fase única para a produção de biogás**. Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) – Universidade de São Paulo, Campinas, 2019.

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.

PAN, N. C. et al. Improvement Production of Hyaluronic Acid by *Streptococcus zooepidemicus* in Sugarcane Molasses. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 182, n. 1, p. 276–293, maio 2017.

PARK, J. P.; YUN, J. W. Utilization of chicory roots for microbial endoinulinase production. **Letters in Applied Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 183–187, 2001.

PAS, M. et al. Iron enriched yeast biomass-a promising mineral feed supplement. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 8, p. 1622–1628, maio 2007.

PINHEIRO, R.; BELO, I.; MOTA, M. Growth and β -galactosidase activity in cultures of *Kluyveromyces marxianus* under increased air pressure. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 438–442, 2003.

PIROTA, R. D. P. B.; DELABONA, P. S.; FARINAS, C. S. Simplification of the Biomass to Ethanol Conversion Process by Using the Whole Medium of Filamentous Fungi Cultivated Under Solid-State Fermentation. **BioEnergy Research**, v. 7, n. 2, p. 744–752, 1 jun. 2014.

PISKUR, J. et al. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? **Trends in genetics: TIG**, v. 22, n. 4, p. 183–186, abr. 2006.

PRADO BARRAGÁN, L. A. et al. Chapter 7 - Fermentative Production Methods. In: POLTRONIERI, P.; D'URSO, O. F. (Eds.). **Biotransformation of Agricultural Waste and By-Products**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 189–217.

RAIMBAULT, M. General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 2, p. 174–188, 15 dez. 1998.

- RAWAT, H. K.; GANAIE, M. A.; KANGO, N. Production of inulinase, fructosyltransferase and sucrase from fungi on low-value inulin-rich substrates and their use in generation of fructose and fructo-oligosaccharides. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 107, n. 3, p. 799–811, 2015b-03-01.
- RAWAT, H. K.; JAIN, S. C.; KANGO, N. Production and properties of inulinase from *Penicillium* sp. NFCC 2768 grown on inulin-rich vegetal infusions. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 33, n. 1, p. 61–68, January 2, 2015a.
- ROCHA, G. J.; BALKZÓ, N. K.; MULINARI, D. R. Obtainment and Characterization of Cellulose from Sugarcane Bagasse Pretreated in Acid Medium. p. 7, 2012.
- ROUKAS, T. Pretreatment of beet molasses to increase pullulan production. **Process Biochemistry**, v. 33, n. 8, p. 805–810, nov. 1998.
- ROUWENHORST, R. et al. Localization of inulinase and invertase in *Kluyveromyces* species. **Applied and environmental microbiology**, v. 56, p. 3329–36, 1 dez. 1990.
- ROUWENHORST, R. J. et al. Production, Distribution, and Kinetic Properties of Inulinase in Continuous Cultures of *Kluyveromyces marxianus* CBS 6556. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1131–1137, maio 1988.
- SADH, P. K.; DUHAN, S.; DUHAN, J. S. Agro-industrial wastes and their utilization using solid state fermentation: a review. **Bioresources and Bioprocessing**, v. 5, n. 1, p. 1, 2 jan. 2018.
- 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.
- SANTOS, M. et al. Variability of brewer's spent grain within a brewery. **Food Chemistry**, v. 80, n. 1, p. 17–21, 1 jan. 2003.
- SANTOS, M.; RIBEIRO, F. **Cervejas e Refrigerantes**. São Paulo: CETESB, 2005.
Disponível em: <https://www.crq4.org.br/downloads/cervejas_refrigerantes.pdf>. Acesso em: 22 jun. 2019.
- SARUP, R.; DHALIWAL, R.; PURI, M. Partial Purification and Characterization of Exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 for Preparation of High-Fructose Syrup. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 15, n. 5, p. 733–738, 2007.
- SCHNEIDER, A. L. DOS S. **Estudo da produção de inulinase por *Kluyveromyces marxianus* ATCC 36907**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1996.
- SCHULTZ, N. et al. Microbial production of single-cell protein from deproteinized whey concentrates. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 69, n. 5, p. 515–520, jan. 2006.

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.

SHAHBANDEH, M. **Leading sugar producers worldwide 2019/2020**. Disponível em: <<https://www.statista.com/statistics/495973/sugar-production-worldwide/>>. Acesso em: 24 fev. 2021.

SHENG, J. et al. Use of response surface methodology for optimizing process parameters for high inulinase production by the marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a in solid-state fermentation and hydrolysis of inulin. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 32, n. 3, p. 333–339, abr. 2009.

SILVA, A. C. DA. et al. Partial characterization of an inulinase produced by *Aspergillus japonicus* URM5633. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 55, n. 5, p. 671–676, out. 2012a.

SILVA, M. DA. **Caracterização da produção e avaliação de indicadores de qualidade tecnológica de amostras de melado do Estado do São Paulo**. Dissertação (Mestrado em Agroecologia e Desenvolvimento Rural) – Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2012b.

SINGH, R.; DHALIWAL, R.; PURI, M. Production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 using root extract of *Asparagus racemosus*. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1703–1707, 1 jul. 2006.

SINGH, R. S. et al. Statistical optimization of solid-state fermentation for the production of fungal inulinase from apple pomace. **Bioresource Technology Reports**, v. 9, p. 100364, 1 fev. 2020.

SINGH, R. S.; BHERMI, H. K. Production of extracellular exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 using root tubers of *Asparagus officinalis*. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 15, p. 7418–7423, out. 2008.

SINGH, R. S.; CHAUHAN, K.; KENNEDY, J. F. A panorama of bacterial inulinases: Production, purification, characterization and industrial applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 96, p. 312–322, mar. 2017.

SINGH, R. S.; SINGH, R. P. Inulinases. In: **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 423–446.

SINGH, R. S.; SINGH, R. P.; KENNEDY, J. F. Endoinulinase production by a new endoinulinase producer *Aspergillus tritici* BGPUP6 using a low cost substrate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 1113–1122, nov. 2016.

SINGH, R. S.; SINGH, T.; LARROCHE, C. Biotechnological applications of inulin-rich feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 273, p. 641–653, 1 fev. 2019.

SINGH, R. S.; SINGH, T.; PANDEY, A. Microbial Enzymes—An Overview. In: **Advances in Enzyme Technology**. Elsevier, 2019. p. 1–40.

SINGH, R.; SINGH, R. Production of Fructooligosaccharides from Inulin by Endoinulinases and Their Prebiotic Potential. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, n. 4, p. 435–450, 2010.

SINGHANIA, R. R. et al. Chapter 13 - Industrial Enzymes. In: PANDEY, A. et al. (Eds.). . **Industrial Biorefineries & White Biotechnology**. Amsterdam: Elsevier, 2015. p. 473–497.

SIVAPATHASEKARAN, C.; SEN, R. Origin, properties, production and purification of microbial surfactants as molecules with immense commercial potential. **Tenside Surfactants Detergents**, v. 54, p. 92–104, 1 mar. 2017.

STEWART, G. G.; PRIEST, F. G. **Handbook of Brewing**. CRC Press, 2006.

TERESITA, M. **Enzimas de Interés Biotecnológico**. In: CÁTEDRA DE BIOTECNOLOGÍA, 2019. Disponível em: <http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/89649/Apunte_de_c%C3%A1tedra.pdf-PDFA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 11 set. 2020

THE STATISTICS PORTAL (TSP). **Beer production worldwide from 1998 to 2017 (in billion hectoliters)**. Disponível em: <<https://www.statista.com/statistics/270275/worldwide-beer-production/>>. Acesso em: 14 abr. 2019.

TOWNSLEY, P. M. Preparation of commercial products from brewer's waste grain and trub. **Master Brewers Association of the Americas**, v. 66, n. 4, p. 130–134, 1979.

TRAPALA, J. et al. Purification and characterization of an inulinase produced by a *Kluyveromyces marxianus* strain isolated from Blue Agave Bagasse. **Protein Expression and Purification**, p. 105718, ago. 2020.

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

TREICHEL, H. et al. Technical viability of the production, partial purification and characterisation of inulinase using pretreated agroindustrial residues. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 32, p. 425–33, 1 out. 2008.

TUSET, S. **Tratamiento y valorización de efluentes en la industria cervecera** *Ingeniería ambiental para el sector industrial*, 25 fev. 2020. Disponível em: <<https://blog.condorchem.com/tratamiento-vertidos-industria-cervecer-a-valorizacion-residuos/>>. Acesso em: 24 fev. 2021

VALENCIA, A. L. L.; ZAPATA, C. D. S. **Remoción de Calcio y Magnesio de la melaza para el mejoramiento del proceso de fermentación**. Tesis (Título de Ingeniero Químico) – Universidad Nacional de Trujillo, Trujillo, Perú, 2014.

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.

VENTURINI FILHO, W. G.; CEREDA, M. P. Cerveja. In: **Biotechnologia Industrial Biotechnologia na Produção de Alimentos**. São Paulo: Edgar Blucher, 2001. p. 233.

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.

VILLAVICENCIO, A. R. N.; SANT'ANNA, E. S.; TÔRRES, R. C. O. Produção de *Lactobacillus plantarum* em Melaço de Cana-de-açúcar. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 42, n. 2, p. 0–0, 1999.

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.

APÊNDICE A – ANOVA E TESTE DE TUKEY (TRATAMENTOS COM CARVÃO ATIVADO)

As Tabelas 26 e 27 mostram os resultados do ANOVA e teste de Tukey, respectivamente, para os grupos de tratamento utilizando carvão ativado em diferentes concentrações.

Tabela 26 – ANOVA unilateral para tratamentos com carvão ativado em melão de cana-de-açúcar em função da atividade inulinase em fermentação submersa

Fator	GL	SS	MS	f	p
Intercepto	1	32903,04	32903,04	14290,80	0,000000
Tratamento com carvão ativado	4	2017,41	504,35	219,06	0,000000
Erro	10	23,02	2,30		
Total	14	2040,44			

SS: Soma dos quadrados; GL: Graus de liberdade; MS: Quadrado médio
Fonte: Autoria própria (2021).

Tabela 27 – Matriz de Tukey das diferenças de médias entre os grupos dos tratamentos com carvão ativado avaliados em função da atividade inulinase.

	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]
Tratamento com carvão ativado	32,226	39,818	44,862	66,617	50,654
Sem tratamento		0,000939	0,000178	0,000176	0,000176
Tratamento C.A. 3%	0,000939		0,015100	0,000176	0,000196
Tratamento C.A. 5%	0,000178	0,015100		0,000176	0,006184
Tratamento C.A. 8%	0,000176	0,000176	0,000176		0,000176
Tratamento C.A. 10%	0,000176	0,000196	0,006184	0,000176	

Fonte: Autoria própria (2021).

APÊNDICE B – ANOVA E TESTE DE TUKEY (TRATAMENTOS COM EDTA)

As Tabelas 28 e 29 mostram os resultados do ANOVA e o teste de Tukey, respectivamente, para os grupos de tratamento utilizando EDTA a diferentes concentrações.

Tabela 28 – ANOVA unilateral para tratamentos com EDTA em melaço de cana-de-açúcar em função da atividade inulinase em fermentação submersa.

Fator	GL	SS	MS	f	p
Intercepto	1	26113,97	26113,97	18246,74	0,000000
Tratamento com EDTA	4	1090,33	272,58	190,46	0,000000
Erro	10	14,31	1,43		
Total	14	1104,64			

SS: Soma dos quadrados; GL: Graus de liberdade; MS: Quadrado médio

Fonte: Aatoria própria (2021).

Tabela 29 – Matriz de Tukey das diferenças de médias entre os grupos dos tratamentos com EDTA avaliados em função da atividade inulinase.

Tratamento com EDTA	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]
	40,049	56,563	42,939	38,756	30,315
Tratamento 100 ppm		0,000176	0,083611	0,684514	0,000179
Tratamento 200 ppm	0,000176		0,000176	0,000176	0,000176
Tratamento 300 ppm	0,083611	0,000176		0,010995	0,000176
Tratamento 400 ppm	0,684514	0,000176	0,010995		0,000200
Sem tratamento	0,000179	0,000176	0,000176	0,000200	

Fonte: Aatoria própria (2021).

APÊNDICE C – ANOVA E TESTE DE TUKEY (TRATAMENTOS ÁCIDOS)

A Tabela 30 e 31 são apresentados os resultados do ANOVA e o teste Tukey dos grupos de tratamento ácidos a diferentes condições.

Tabela 30 – ANOVA unilateral para tratamentos com ácido sulfúrico em melão de cana-de-açúcar em função da atividade da inulinase em fermentação submersa.

Fator	GL	SS	MS	f	p
Intercepto	1	75985,13	75985,13	50002,31	0,000000
Tratamento com ácido sulfúrico	2	16140,11	8070,05	5310,53	0,000000
Erro	6	9,12	1,52		
Total	8	16149,23			

SS: Soma dos quadrados; GL: Graus de liberdade; MS: Quadrado médio

Fonte: Autoria própria (2021).

Tabela 31 – Matriz de Tukey das diferenças de médias entre os grupos dos tratamentos ácidos avaliados em função da atividade inulinase.

Tratamento ácido	[1]	[2]	[3]
	111,93	129,08	32,64
Tratamento 1: pH inicial 3 / pH final 5,5		0,000229	0,000227
Tratamento 2: pH inicial 5 / pH final 4,0	0,000229		0,000227
Sem tratamento	0,000227	0,000227	

Fonte: Autoria própria (2021).