



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO EM ENGENHARIA
QUÍMICA



Utilização do bagaço de malte em bioprocessos: prospecção de potenciais bioprodutos por via biotecnológica

Autor: Andrei Weber Viera

Orientadoras: Prof^a Dr^a Daniele Misturini Rossi

Prof^a Dr^a Débora Jung Luvizetto Faccin

Porto Alegre, outubro de 2022

Autor: Andrei Weber Viera

Utilização do bagaço de malte em bioprocessos: prospecção de potenciais bioprodutos por via biotecnológica

*Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
COMGRAD/ENQ da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul como parte dos requisitos para a
obtenção do título de Bacharel em Engenharia
Química*

Prof^a Dr^a Daniele Misturini Rossi e Prof^a Dr^a Débora Jung Luvizetto Faccin

Banca Examinadora:

Prof^a Dr^a Caroline Borges Agustini, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a Dr^a Mariana Fensterseifer Fabricio, Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre

2022

AGRADECIMENTOS

À minha família, especialmente, aos meus pais, Rogério e Maristela, que sempre me apoiaram e incentivaram desde pequeno e à minha irmã, Naiane, que sempre esteve ao meu lado.

À minha namorada, Isabeli, por todo o amor e carinho demonstrado e por sempre estar ao meu lado, me apoiando quando eu mais preciso.

Às minhas orientadoras, Prof^a Dr^a Débora Jung Luvizetto Faccin Rossi e Prof^a Dr^a Débora Jung Luvizetto Faccin, por todos os ensinamentos e auxílios, que, com toda certeza, foram cruciais para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo ensino proporcionado na minha formação acadêmica, em especial ao Departamento de Engenharia Química e aos professores, que participaram desta caminhada.

Aos meus amigos, que tornaram essa caminhada mais alegre e divertida, com bons momentos e risadas, facilitando esta jornada.

E a todos os demais que, de alguma maneira, contribuíram para que este sonho pudesse ser realizado.

RESUMO

A procura pela utilização de resíduos biotecnológicos vem crescendo por causa de preocupação quanto à sustentabilidade de processos industriais e quanto à reutilização de recursos energéticos. A biomassa lignocelulósica é a mais abundante do planeta e pode ser usada como um substrato de baixo custo para produção de diversos bioprodutos, tais como ácido lático, etanol e 2,3-butanodiol (2,3-BD). Com isso, o presente trabalho teve como objetivo analisar a produção desses compostos via processos de bioconversão, utilizando microrganismos distintos. Para isso, foi utilizado o bagaço de malte, resíduo da indústria cervejeira, gerado na etapa de mosturação, composto de celulose, hemicelulose e lignina, além de proteínas e extrativos, que podem servir como fonte de carbono e nutrientes em bioprocessos. Neste estudo, um tratamento ácido diluído foi realizado no bagaço de malte, a fim de liberar os açúcares presentes, servindo como potencial fonte de carbono para os microrganismos estudados. O primeiro experimento de *screening* serviu para selecionar potenciais produtores dos bioprodutos de interesse, destacando-se nesta etapa, *Lactobacillus maltaromicus* e *Lactobacillus plantarum*, os quais obtiveram maior consumo de açúcares presentes no meio e maior produção de ácido lático. Os experimentos foram realizados em agitador orbital na condição de microaerofilia a 30°C e 150 rpm. Com *L. maltaromicus*, foi possível obter um rendimento de ácido lático (Y_{PS}) igual a 1,09 g.g⁻¹ e uma produtividade (Q_P) de 0,01 g.(L.h)⁻¹. Já, ao estudar a *L. plantarum*, foi possível obter um rendimento e produtividade maior para o ácido lático iguais a 1,79 g.g⁻¹ e 0,06 g.(L.h)⁻¹, respectivamente. A *L. plantarum* demonstrou ser bastante eficiente consumindo mais de 70% da glicose presente no meio e a *L. maltaromicus* consumiu aproximadamente 10% da glicose presente. Além disso, é possível concluir que tanto a *Pantoea agglomerans* e a *Klebsiella pneumoniae* são microrganismos capazes de produzir 2,3-butanodiol e, também, de consumir toda glicose e arabinose, além de mais da metade de xilose, presentes no hidrolisado de malte diluído. Nota-se também que a obtenção de bioprodutos no hidrolisado de malte diluído foi maior que no hidrolisado de malte concentrado devido ao fato da pressão osmótica no meio concentrado ter inibido o crescimento microbiano, dificultando a conversão de bioprodutos.

Palavras-chave: bagaço de malte, ácido lático, biomassa lignocelulósica, bioprocessos, *Lactobacillus*.

ABSTRACT

The demand for the use of biotechnological waste has been growing because of concern about the sustainability of industrial processes and about the reuse of energy resources. Lignocellulosic biomass is the most abundant on the planet and can be used as a low-cost substrate for the production of various bioproducts, such as lactic acid, ethanol and 2,3-butanediol (2,3-BD). Thus, the present work aimed to analyze the production of these compounds via bioconversion processes, using different microorganisms. For this, brewer's spent grain was used, a residue from the brewing industry, generated in the mashing stage, composed of cellulose, hemicellulose and lignin, in addition to proteins and extractives, which can serve as a source of carbon and nutrients in bioprocesses. In this study, a dilute acid treatment was carried out on brewer's spent grain, in order to release the sugars present, serving as a potential carbon source for the microorganisms studied. The first screening experiment was performed to select potential producers of the bioproducts of interest, highlighting at this stage, *Lactobacillus maltaomicus* and *Lactobacillus plantarum*, which obtained higher consumption of sugars present in the medium and higher production of lactic acid. The experiments were carried out in an orbital shaker in the microaerophilic condition at 30°C and 150 rpm with Erlenmeyer flasks sealed with an oxygen permeable cotton swab. *L. maltaromicus* obtained a lactic acid yield (Y_{PS}) equal to 1,09 g.g⁻¹ and a productivity (Q_P) of 0,01 g.(L.h)⁻¹. On the other hand, when studying *L. plantarum*, it was possible to obtain a higher yield and productivity for lactic acid equal to 1,79 g.g⁻¹ and 0,06 g.(L.h)⁻¹, respectively. *L. plantarum* proved to be quite efficient, consuming more than 70% of the glucose present in the medium and *L. maltanomicus* consumed approximately 10% of the glucose present. Furthermore, it is possible to conclude that both *Pantoea aglomerans* and *Klebsiella pneumoniae* are microorganisms capable of producing 2,3-butanediol and also of consuming all glucose and arabinose, in addition to more than half of xylose, present in the diluted malt hydrolyzate. It is also noted that the obtaining of bioproducts in the diluted malt hydrolyzate was higher than in the concentrated malt hydrolyzate due to the fact that the osmotic pressure in the concentrated medium inhibited microbial growth, making the conversion of byproducts more difficult.

Keywords: brewer's spent grain, lactic acid, lignocellulosic biomass, bioprocesses, *Lactobacillus*.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 Pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas (Fonte: MONTIPÓ, 2012)..... | 4 |
| Figura 2 Hidrólise da celulose catalisada por ácido (Fonte: CAMARGO, 2020) | 4 |
| Figura 3 Bagaço de malte <i>in natura</i> (foto autoral)..... | 6 |
| Figura 4 Estereoisômeros do ácido lático (Fonte: MARTINEZ et al., 2013) | 7 |
| Figura 5 Caminhos metabólicos para a produção de ácido lático utilizando açúcares derivados de fontes renováveis (glicose, xilose, celobiose, arabinose, manose e galactose (Fonte: WANG <i>et al.</i> , 2015) | 9 |
| Figura 6 Estereoisômeros do 2,3-butanodiol (Fonte: JI; HUANG; OUYAN, 2011) | 10 |
| Figura 7 Diferentes rotas metabólicas da glicose e da xilose (Fonte: GURAGAIN, 2017)..... | 11 |
| Figura 8 Fluxograma temporal do presente trabalho | 12 |
| Figura 9 Screening dos microrganismos selecionados e produtos formados..... | 18 |
| Figura 10 Análise de pH dos hidrolisados..... | 19 |
| Figura 11 <i>Lactobacillus plantarum</i> à esquerda e <i>Lactobacillus maltaromicus</i> à direita (Imagem autoral)..... | 20 |
| Figura 12 Estudo de reação cinética da <i>Lactobacillus maltaromicus</i> com pH inicial de 6,16 a 30 °C e 150 rpm | 21 |
| Figura 13 Estudo de reação cinética da <i>Lactobacillus plantarum</i> com pH inicial de 6,13 a 30°C e 150 rpm..... | 22 |
| Figura 14 Análise de crescimento celular de <i>Lactobacillus plantarum</i> depois de 3 horas de fermentação à esquerda e após 30 horas à direita (Foto autoral) | 23 |
| Figura 15 Análise de crescimento celular de <i>Lactobacillus maltaromicus</i> no ponto inicial da fermentação à esquerda e após 12 horas à direita (Foto autoral) | 24 |
| Figura 16 Cinética de células viáveis (UFC/mL), consumo de glicose (g.L ⁻¹) e produção de ácido lático (g.L ⁻¹) pela bactéria <i>Lactobacillus plantarum</i> | 24 |
| Figura 17 Cinética de células viáveis (UFC/mL), consumo de glicose (g.L ⁻¹) e produção de ácido lático (g.L ⁻¹) pela bactéria <i>Lactobacillus maltaromicus</i> | 25 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 Composição do MRS com ajuste de pH em 6,80 | 14 |
| Tabela 2 Composição de açúcares presentes no hidrolisado diluído e concentrado | 17 |
| Tabela 3 Bactérias produtoras de ácido láctico e respectivos parâmetros cinéticos (Fonte: WEE <i>et al.</i> , 2006)..... | 22 |
| Tabela 4 Consumo de glicose e produção de ácido láctico na fermentação do meio hidrolisado de bagaço concentrado em 48 horas de produção | 23 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------|-------------------------------|
| MRS | De Man, Rogosa e Sharpe |
| BSG | <i>Brewer's spent grain</i> |
| AL | Ácido láctico |
| PLA | Ácido polilático |
| LB | Luria-Bertrani |
| BAL | Bactérias ácido lácticas |
| HMF | Hidroximetilfurfural |
| pH | Potencial Hidrogeniônico |
| UFC | Unidade Formadora de Colônias |
| 2,3-BD | 2,3-Butanodiol |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|--------------------------------|---------------------|
| D-(-) | Isômero Dextrogiro |
| L-(+) | Isômero Levogiro |
| kg | quilograma |
| kgf | quilograma-força |
| kJ | quilojoule |
| cm | centímetro |
| rpm | rotações por minuto |
| mL | mililitro |
| nm | nanômetro |
| µm | micrômetro |
| g | Gramas |
| L | Litro |
| µL | microlitro |
| mM | milimolar |
| h | Hora |
| min | minuto |
| H ₂ SO ₄ | Ácido Sulfúrico |
| NaOH | Hidróxido de Sódio |
| Q _P | Produtividade |
| Y _{PS} | Rendimento |

SUMÁRIO

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Introdução | 1 |
| 2 | Revisão Bibliográfica | 3 |
| 2.1 | Resíduos agroindustriais | 3 |
| 2.2 | Bagaço de malte | 4 |
| 2.3 | Produtos de importância biotecnológica | 7 |
| 2.3.1 | Ácido Lático | 7 |
| 2.3.2 | Etanol | 9 |
| 2.3.3 | 2,3-Butanodiol | 10 |
| 3 | Materiais e Métodos | 12 |
| 3.1 | Hidrolisado de malte | 12 |
| 3.2 | Microrganismos | 12 |
| 3.3 | <i>Screening</i> para produção de bioprodutos de interesse | 13 |
| 3.4 | Análise de coloração Gram | 13 |
| 3.5 | Ensaio de fermentação | 14 |
| 3.6 | Análise de crescimento celular | 14 |
| 3.7 | Metodologia analítica | 15 |
| 3.8 | Cálculo dos parâmetros cinéticos | 16 |
| 4 | Resultados e Discussão | 17 |
| 4.1 | Hidrolisado de bagaço de malte | 17 |
| 4.2 | <i>Screening</i> dos microrganismos | 17 |
| 4.3 | Análise de Coloração Gram | 19 |
| 4.4 | Cinética de fermentação das BAL | 20 |
| 4.5 | Análise de Crescimento Celular | 23 |
| 5 | Conclusões e Trabalhos Futuros | 26 |
| | REFERÊNCIAS | 27 |

1 Introdução

A busca por processos sustentáveis vem ganhando cada vez mais atenção de forma a minimizar os efeitos danosos de atividades industriais. Neste sentido, há um constante aumento na procura de produtos obtidos a partir de recursos renováveis aliado à busca de inovação. Isso reflete no fato de estarmos vivendo uma época de melhoria de aproveitamento energético natural, buscando, assim, reaproveitar resíduos de processos industriais.

Neste contexto, a produção de bioprodutos, tais como, ácido láctico, etanol e 2,3-butanodiol, vem crescendo cada vez mais. O ácido láctico (AL) é uma molécula de grande potencial, pois pode ser aplicado em diversas indústrias, assim como na produção de polímeros biodegradáveis. O poli (ácido láctico) ou poli (lactídeo) (PLA) é um dos biopolímeros mais promissores devido à sua excelente biocompatibilidade, baixa toxicidade, boas propriedades mecânicas e ao fato de que este polímero pode ser produzido a partir de um ácido orgânico de ocorrência natural, sendo bioreabsorvível. O monômero inicial do PLA, o ácido láctico (AL), pode ser utilizado para a produção industrial de AL, utilizando-se a fermentação de açúcares obtidos a partir de recursos renováveis como a cana-de-açúcar e resíduos agroindústrias. O bioetanol, por sua vez, que pode ser produzido a partir da biomassa lignocelulósica, desponta como tecnologia promissora, devido ao seu caráter renovável. A obtenção de bioetanol lignocelulósico envolve processos de sacarificação da celulose e da hemicelulose presentes na biomassa, até a sua conversão em etanol por ação de microrganismos fermentativos. Já, o 2,3-butanodiol é utilizado em diversas áreas, sendo intermediário na produção de borracha sintética e até mesmo como aditivo na indústria alimentícia.

Para obtenção destes bioprodutos via bioconversão, são utilizados microrganismos em meios de cultivo que apresentem açúcares os quais possam ser utilizados como fonte de carbono nos produtos de interesse. O bagaço de malte, por exemplo, é composto, de uma forma geral, por celulose, hemicelulose, lignina e proteínas.

A celulose é um carboidrato do tipo polissacarídeo, formada por monômeros de glicose e a hemicelulose, por sua vez, é uma matriz altamente ramificada constituída por pentoses (xilose e arabinose), hexoses (manose, glicose e galactose) e ácidos urônicos.

Com o intuito de obter um aproveitamento maior deste resíduo gerado em grandes quantidades, o presente trabalho teve como objetivo estudar a fermentação em hidrolisados ácidos de bagaço de malte como potencial fonte de carbono e nutrientes para a produção de compostos de alto valor agregado. Entre eles, destacam-se o ácido láctico, etanol e 2,3-butanodiol.

Para tal, os objetivos específicos são:

- Tratamento do bagaço de malte para liberação dos açúcares fermentescíveis, através da hidrólise ácida diluída;
- Seleção de potenciais microrganismos produtores de bioprodutos, através da etapa de *screening*;

- Avaliação da cinética de produção de compostos de interesse em modo batelada, utilizando os microrganismos selecionados através da quantificação dos bioprodutos obtidos, do consumo dos açúcares presentes no hidrolisado, do acompanhamento da variação do pH durante os ensaios de fermentação e do crescimento microbiano; e
- Cálculo dos parâmetros cinéticos dos cultivos realizados;

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Resíduos agroindustriais

Atualmente, as alternativas de valorização de resíduos através do seu reaproveitamento em diversas áreas têm sido bastante impulsionadas, visto que podem minimizar a poluição ambiental e os custos de produção, além de permitir a valorização econômica desses resíduos (RECH; ZORZAN, 2017).

O agronegócio é um setor produtivo e muito promissor, apresentando expansão ano após ano. Com isso, estima-se que são produzidas na ordem de 140 bilhões de toneladas de resíduos agroindustriais por ano no mundo, sendo que o Brasil produz mais de 450 milhões de toneladas de resíduos anuais (JUNIOR, 2020).

A geração de resíduos agroindustriais representa perdas econômicas, ainda que uma parcela destes possa ser reutilizada em produtos de baixo valor agregado como, por exemplo, para produção de ração animal. Estes resíduos possuem quantidades expressivas de carbono, armazenadas em moléculas complexas. Dentre os resíduos agroindustriais, destacam-se os lignocelulósicos.

A lignocelulose é a biomassa mais abundante do mundo, sendo composta principalmente por lignina, celulose e hemicelulose. A lignina é o material aromático renovável mais abundante do planeta e o segundo polímero orgânico mais abundante depois da celulose.

A celulose é um carboidrato do tipo polissacarídeo, ou seja, é um polímero de glicose, e, por fim, a hemicelulose é um polímero composto de pentoses como arabinose, xilose e ribose (MACHADO, 2018; LOURENÇON, 2020).

O resíduo úmido de cervejaria, bagaço de malte, é um material lignocelulósico e possui um grande destaque por ser gerado em grande quantidade durante todo o ano (RECH; ZORZAN, 2017). Segundo os dados mais recentes da CervBrasil, o Brasil produz anualmente mais de 14 bilhões de litros de cerveja por ano, sendo que são gerados cerca de 14 a 20 kg de bagaço de malte, principal resíduo do processo cervejeiro, a cada 100 litros de cerveja produzida (CervBrasil, 2018; FRANCISKIEVICZ et al., 2020).

O bagaço de malte, BSG (sigla do inglês "*brewer's spent grain*"), como todo material lignocelulósico, possui uma camada de lignina que protege a celulose e a hemicelulose, impossibilitando que microrganismos consumam os açúcares presentes nas mesmas. Desta forma, a biomassa lignocelulósica é submetida a pré-tratamentos que a tornam acessível, então a celulose e a hemicelulose sofrem hidrólise com sua transformação em açúcares que podem ser utilizados por microrganismos (CHETRARIU; DABIJA, 2020).

Os pré-tratamentos químicos, que estão associados às reações químicas que interrompem as interações de componentes lignocelulósicos, dissolvem a hemicelulose e a lignina, expondo a celulose à ácidos e/ou à hidrólise enzimática (LOPES, 2012). Um exemplo de pré-tratamento de biomassas lignocelulósicas é mostrado na Figura 1, demonstrando o rompimento do complexo lignocelulósico e, assim, aumentando a digestibilidade da celulose.

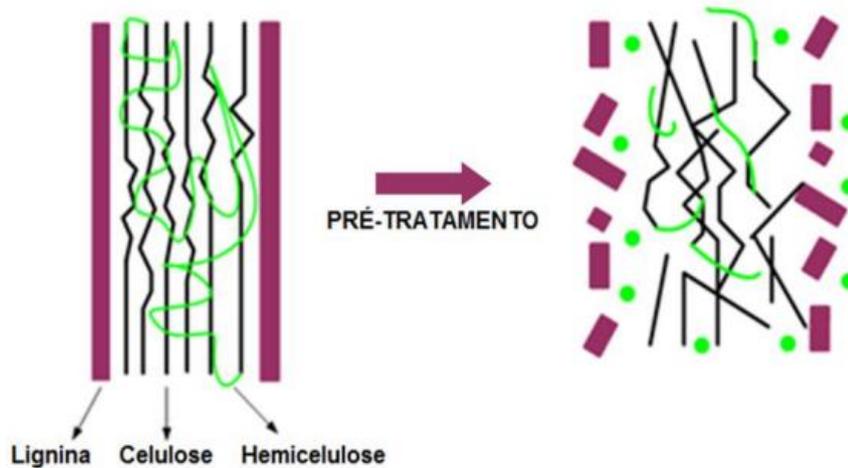


Figura 1 Pré-tratamento de biomassa lignocelulósica (Fonte: MONTIPÓ, 2012).

Na hidrólise de hemiceluloses, se utiliza ácido sulfúrico diluído, diferente da hidrólise de celulose, na qual requer elevadas temperaturas, grandes tempos de exposição e altas concentrações de ácido, devido à maior resistência ao ataque hidrolítico (CAMARGO, 2020). A reação da hidrólise catalisada por ácido está apresentada na Figura 2, na qual é possível notar a quebra do polímero, celulose, em seu respectivo monômero, glicose, no meio ácido.

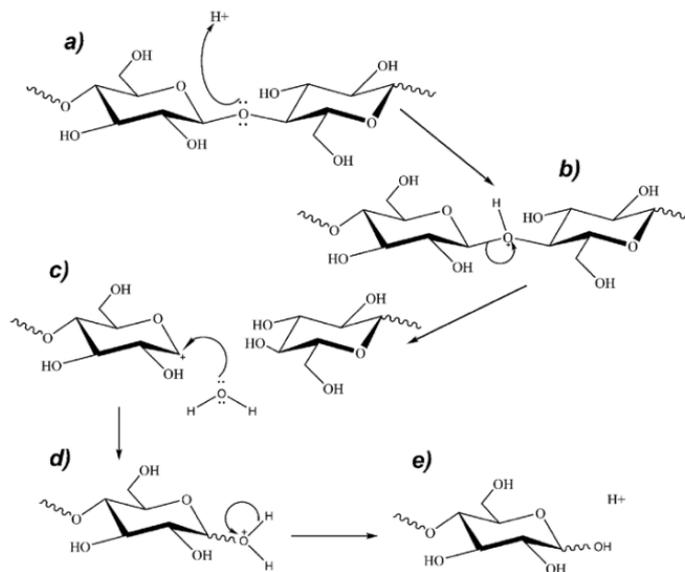


Figura 2 Hidrólise da celulose catalisada por ácido (Fonte: CAMARGO, 2020)

2.2 Bagaço de malte

Cerveja é a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro oriundo do malte de cevada e água potável, por ação da levedura, com adição de lúpulo (DE ASSIS et al., 2021).

A cerveja é a bebida fermentada mais popular do mundo, sendo a mais consumida desde os tempos antigos (SILVA, 2018). Há 4800 anos atrás, os babilônios já fabricavam diversos tipos de cerveja. Existem documentos que relatam as histórias e as lendas ligadas à cerveja dos povos hititas, armênios, gregos, egípcios e outros (MATTOS, 2010).

No Brasil, a cerveja demorou para chegar, pois os portugueses tinham medo de perder o poder de venda de seus vinhos. Sendo assim, o hábito de beber cerveja no país começou somente na época em que a colônia dos ingleses no Brasil importava a bebida da Europa, perdurando até o final do século XX. Já as primeiras indústrias nacionais, surgiram na época da Proclamação da República, em 1889, sendo que essas cervejas produzidas dentro do país possuíam um grau de fermentação elevado, pois mesmo depois de engarrafadas, era produzida uma enorme quantidade de gás carbônico (MATTOS, 2010).

Existem 1383 cervejarias, o que representa um aumento de 14,4 % com relação a 2019, que havia 1209 cervejarias. (CervBrasil, 2020). Em 2016, o Brasil produziu mais de 14 bilhões de litros de cerveja, contribuindo com 1,6 % do PIB anual do país, gerando 2,7 milhões de empregos e arrecadando 21 bilhões de reais em impostos. Nesse ano, o Brasil foi o terceiro maior produtor de cerveja mundial, ficando atrás somente da China e dos Estados Unidos (MASSARDI; MASSINI; SILVA, 2020).

Um revés à alta produção é a grande quantidade de resíduos sólidos e líquidos gerados nas indústrias. O principal e mais abundante é o bagaço de malte, que é gerado na etapa de mosturação, correspondendo a 85 % de todos os resíduos gerados (MASSARDI; MASSINI; SILVA, 2020).

O malte é obtido a partir da cevada, sendo que qualquer cereal pode passar pelo processo de malteação, porém somente a cevada recebe o nome de malte propriamente dito. Além disso, o processo de malteação do grão de cevada consiste em uma transformação enzimática onde o amido presente no endosperma é convertido em açúcares fermentáveis, essencial para a produção da cerveja (DE SOUZA, 2021).

O bagaço do malte possui composição diversa, pois depende de uma variedade de tipos comerciais e processos de fabricação. Em geral, tem-se: celulose (16,8 % - 20,6 %), hemicelulose (18,4 % - 28,4 %), lignina (9,9 % - 27,8 %), proteínas (15,3 % - 26,6 %), extrativos (5,2 % - 5,8 %) e cinzas (2,7 % - 4,6 %) (MASSARDI et al., 2020). Estima-se que o Brasil produz em média de 1,7 milhões de toneladas de bagaço de malte por ano, sendo este material aproveitado como ração para animais, porém este reaproveitamento não suporta a demanda de resíduo gerado (MUSSATTO et al., 2004). Na Figura 3, está apresentado uma amostra do bagaço de malte utilizado.

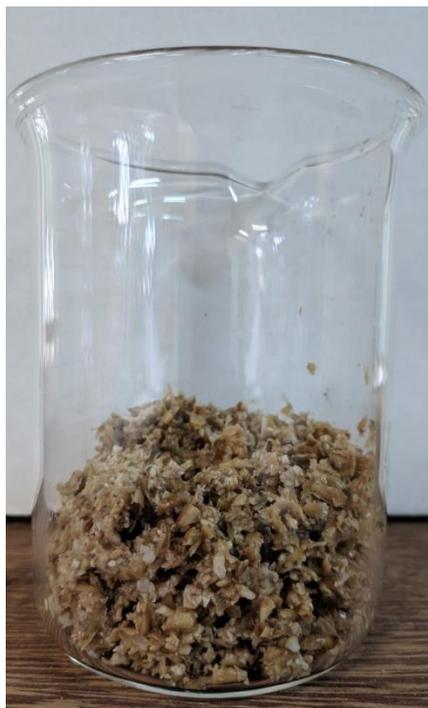


Figura 3 Bagaço de malte *in natura* (foto autoral)

O bagaço de malte é utilizado, principalmente, para alimentar animais, dentre eles, os ruminantes, peixes, aves e porcos. Além disso, alguns microrganismos, como *Streptomyces*, *Lentinus*, *Peurotus*, *Trichoderma* e *Agrocybe*, podem ser cultivados com meios suplementados. Para aumentar a produção de enzimas, como celulasas e α -amilases, o bagaço de malte é usado como substrato com outros ingredientes, como vitaminas e aminoácidos, para cultivar diferentes cepas de fungos (PABBATHI, 2022).

No corpo humano, o BSG também pode atuar na suplementação na dieta humana, ajudando pessoas com cálculos biliares, diarreia, problemas de constipação, diabéticos e até mesmo pacientes cardíacos. Isso se deve ao fato da presença de fibras alimentares, alto teor de proteína e presença de polissacarídeos complexos em sua composição (PABBATHI, 2022).

É possível obter ácido lático de biomassa lignocelulósica, sendo este sacarificado através de métodos químicos ou então por fermentação realizada por bactérias ácido lácticas, tais como *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus pentosus* e *Lactobacillus rhammosus* (PABBATHI, 2022).

Outras áreas de utilização do bagaço de malte é a produção de farinha (RÊGO; BRITO, 2021), de bioetanol (LIMA et al., 2014), de ração animal (GOMES, 2010), de carvão ativado (FRANCISKI, 2018), de pectinases (DA SILVA et al., 2021), de gelato cervejeiro (NASCIMENTO, 2020), entre outras aplicações, porém, mesmo com todas as áreas de reaproveitamento deste resíduo descritas, os reaproveitamentos não conseguem fazer uso de todo o bagaço de malte gerado.

2.3 Produtos de importância biotecnológica

Os materiais lignocelulósicos, tais como os resíduos agrícolas, são uma abundante e renovável fonte de celulose e hemicelulose que podem servir como fonte de substratos para produção de diversos compostos químicos por processo fermentativo. Os materiais lignocelulósicos contêm açúcares polimerizados que podem ser liberados por hidrólise, e subsequentemente, fermentados por diversos microrganismos. O emprego desses materiais para a produção de bioprodutos de interesse comercial, como 1,3-propanodiol, 2,3-butanodiol, ácidos orgânicos, entre eles ácido láctico e ácido acético e etanol tem sido considerado de interesse na área de conversão de biomassa em combustíveis líquidos e substâncias químicas de interesse para a indústria. Sendo assim, nesta seção serão descritas mais informações sobre alguns dos produtos de interesse.

2.3.1 Ácido Láctico

O ácido láctico (nomenclatura IUPAC ácido 2-hidróxi-propanóico) é o ácido orgânico mais importante, devido ao seu poder nas industriais como regulador de pH, conservante, agente tamponante ou solvente, podendo atuar nas áreas química, farmacêutica, alimentícia, têxtil e curtume (FERNANDES et al., 2007). Além disso, apresenta isomeria óptica, podendo ser L-(+)-ácido láctico (L-LA) e D-(-)-ácido láctico (D-LA), sendo que ambos são apresentados na Figura 4. A proporção de cada isômero na mistura racêmica é um fator muito importante, pois dependendo da sua composição, propriedades diferentes são adquiridas à mistura final (MACHADO, 2020).

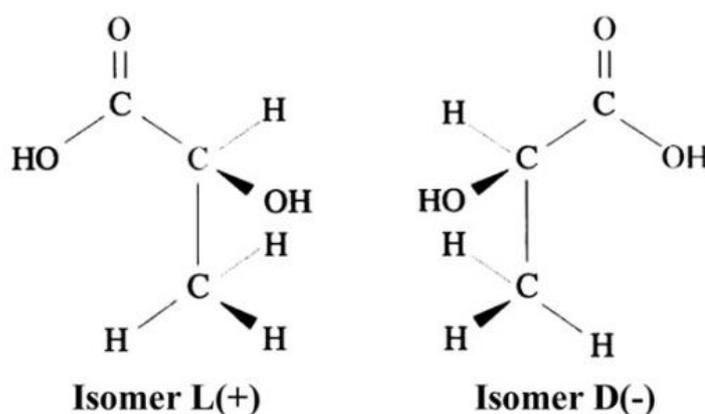


Figura 4 Estereoisômeros do ácido láctico (Fonte: MARTINEZ et al., 2013)

No setor químico, o ácido láctico tem sido utilizado para se obter plásticos biodegradáveis e para confecção de embalagens rígidas e flexíveis para acondicionamento de alimentos e outros produtos (HONORATO et al., 2007).

Há um aumento de interesse na pesquisa e desenvolvimento de materiais para utilização em embalagens biodegradáveis a partir de recursos naturais, principalmente em países europeus, pois a maioria dos materiais plásticos de origem petroquímica acaba sendo resistente biologicamente, já que microrganismos não possuem enzimas capazes de induzir sua biodegradação. Ainda, o plástico possui caráter hidrofóbico, inibindo, assim, a atividade

destas enzimas. Atualmente, os métodos mais comuns de eliminação desses materiais são a reciclagem, incineração e aterro, já que o plástico não é degradado facilmente nos ambientes naturais. (MENDES, 2013).

O poliácido láctico (PLA) é um importante polímero biodegradável obtido de fontes renováveis, sendo produzido e comercializado em escala mundial com produção de 370 mil toneladas anual em 2017. Possui aplicações nas áreas de embalagens, utensílios domésticos e peças com aplicações biomédicas (DE OLIVEIRA; BORGES, 2020).

A produção biológica do ácido láctico possui diversas vantagens em comparação com a produção química. Essas vantagens incluem alta especificidade óptica, redução no uso de substratos derivados de petroquímicos e capacidade de transformar matérias primas como soro de leite, melão, bagaço de cana-de-açúcar e amido (EL-SHESHTAWY *et al.*, 2022).

As bactérias lácticas podem ser tanto homofermentadoras quanto heterofermentadoras. As bactérias homofermentadoras produzem lactato como principal produto e, posteriormente, ácido láctico, enquanto as bactérias heterofermentadoras produzem lactato juntamente com outros compostos como, por exemplo, o acetato, produzindo, assim, outros produtos além do ácido láctico (MENDONÇA, 2014).

As bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus* são as mais conhecidas e com maior número de espécies e subespécies de bactérias lácticas, tendo mais de 200 espécies e subespécies desse gênero (PEREIRA, 2019). Essas bactérias acidófilas são cocos ou bacilos Gram (+) incapazes de formar esporos e podem ser estritamente fermentativas, anaeróbias ou aerotolerantes (LOPES, 2008).

O pH é um fator de grande efeito sobre os microrganismos, já que o crescimento celular pode ser resultado de reações enzimáticas. O pH ótimo para o crescimento das células e produção de ácido láctico acaba variando, pois depende do substrato e do microrganismo utilizado. Conforme a concentração de ácido láctico vai aumentando devido à reação, o pH do meio vai diminuindo, ou seja, vai acidificando. Já que as bactérias ácido lácticas crescem em pH preferencialmente entre 5 e 7, a acidificação excessiva inibe a fermentação das mesmas (LAUFFER, 2019).

Sobre a temperatura, sabe-se que, em altas temperaturas, há a degradação celular e, em temperaturas mais baixas, há uma tendência de diminuição na taxa metabólica. O crescimento celular tem valor máximo em temperatura ótima, normalmente, entre a faixa de 30 - 35°C, sendo o ideal para a fermentação de bactérias (MACHADO, 2018). A temperatura ótima para crescimento varia de acordo com o gênero do microrganismo, sendo que, a maioria dos *Lactobacillus* é mesófila, e a temperatura ideal varia de 20 °C a 45 °C (SOUZA, 2014). Para temperaturas maiores que 45 °C, a produção de compostos pelos microrganismos aumenta, porém não o suficiente para compensar os custos energéticos adicionais do processo.

As bactérias lácticas exigem fontes orgânicas de carbono e, destas, a melhor é o carboidrato, particularmente glicose, podendo-se utilizar também aminoácidos, lipídeos, alcoóis e mesmo polímeros como amido e celulose. Na verdade, qualquer composto orgânico natural ou sintético pode ser utilizado como fonte de carbono para esses microrganismos (SOUZA, 2014).

quebra de moléculas de celulose e produção de açúcares, para então produzir o etanol por meio de processos fermentativos alcoólicos (BASTOS, 2007).

O etanol é um líquido incolor e altamente inflamável, sendo um composto de extrema importância devido ao seu alto desempenho na matriz energética mundial, porém, a sua utilização não está restrita apenas a produção de energia. O etanol, primeiramente, era utilizado na indústria alimentícia e, atualmente, pode ser usado como solvente ou então na indústria de higiene e limpeza (FERREIRA, 2010).

Para a produção de etanol, diversos gêneros de leveduras, fungos e bactérias são usados, tais como *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* e *Pachysolen tannophilus*, que apresentam uma boa eficiência no consumo de xilose para produção de etanol (FERREIRA, 2010).

2.3.3 2,3-Butanodiol

O 2,3-butanodiol é um líquido incolor de grande interesse econômico e comercial para aplicação como anticongelante, devido ao baixo ponto de fusão de aproximadamente -60 °C. Além disso, pode ser usado como combustível, já que apresenta um calor de combustão igual a 27.200 kJ/kg, sendo muito próximo ao etanol, que possui um calor de combustão de 29.100 kJ/kg. Ainda, o 2,3-Butanodiol (2,3-BD) é um composto biodegradável, podendo ser utilizado como solvente ou então como agente de ligação para produção de tintas e polímeros que não agridem o meio ambiente (GARCIA, 2006). Na Figura 6, é mostrado os estereoisômeros que o 2,3-butanodiol pode ter.

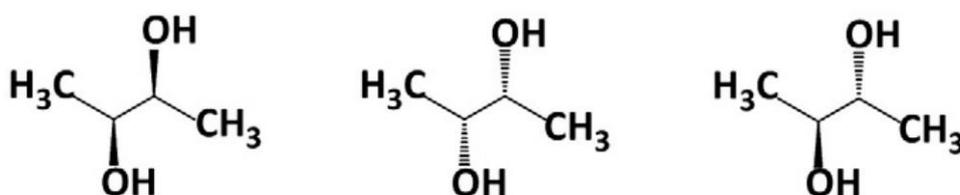


Figura 6 Estereoisômeros do 2,3-butanodiol (Fonte: JI; HUANG; OUYAN, 2011)

Diversas espécies de microrganismos são capazes de sintetizar o 2,3-butanodiol, sendo que os gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Bacillus* e *Serratia* possuem algumas das espécies mais conhecidas capazes de sintetizar 2,3-butanodiol. As espécies *Klebsiella pneumoniae* e *Paenibacillus polymyxa* são as mais empregadas na produção industrial de 2,3-butanodiol (SANTOS, 2012).

A *Klebsiella pneumoniae* acaba sendo o principal agente fermentador na fermentação butileno-glicólica, pois esta bactéria apresenta estabilidade genética, evitando problemas de degeneração por sucessivas repicagens e, além disso, possui flexibilidade quanto a utilização de substratos, sendo capaz de metabolizar todos os principais açúcares presentes nos hidrolisados hemicelulósicos e celulósicos (GARCIA, 2006).

A maioria dos microrganismos utilizam processos de fermentação ácida para produzir 2,3-BD, juntamente com subprodutos (GURAGAIN, 2017), como mostrado na Figura 7, onde está apresentada a rota metabólica do 2,3-BD a partir de resíduos lignocelulósicos.

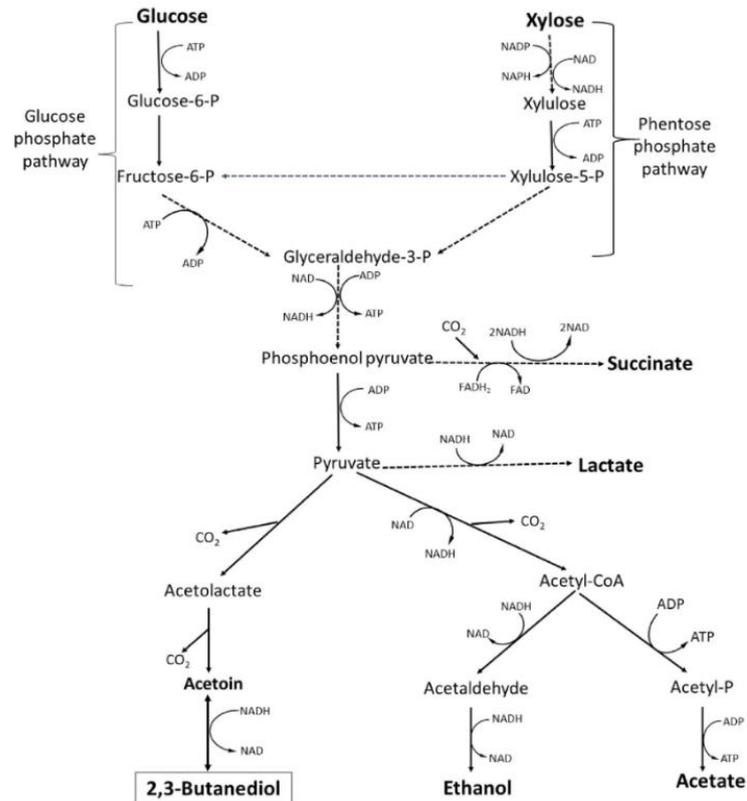


Figura 7 Diferentes rotas metabólicas da glicose e da xilose (Fonte: GURAGAIN, 2017)

De acordo com a literatura, a concentração de glicose ou xilose que resulta em maiores valores de produtividade de 2,3-BD é igual a 100 g.L⁻¹. A ótima concentração de açúcares também depende do tipo de fonte de carbono utilizada, pois com um aumento na concentração de açúcares, há também um aumento na concentração de possíveis inibidores como o meio proveniente de materiais lignocelulósicos (GARCIA, 2006).

3 Materiais e Métodos

Neste capítulo, serão abordados os materiais e métodos para o desenvolvimento do presente trabalho. Na Figura 8, é apresentado o fluxograma temporal para melhor entendimento do estudo e, nas próximas seções, serão detalhados cada um dos tópicos apresentados no fluxograma.



Figura 8 Fluxograma temporal do presente trabalho

3.1 Hidrolisado de malte

O bagaço de malte que foi usado para o desenvolvimento desse estudo foi fornecido pela cervejaria Navegantes, localizada em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, após o processo de mosturação. O pré-tratamento de hidrólise ácida do bagaço de malte foi realizado em autoclave a 111 °C e 0,5 kgf.cm⁻² durante 1 hora, com 1 % em volume de ácido sulfúrico (H₂SO₄) e foi utilizada a proporção de 1:10 na relação sólido:líquido, conforme a metodologia descrita por CASSALES *et al.* (2011). Após esta etapa, a solução foi resfriada a temperatura ambiente e, posteriormente, filtrada, sendo que a fase líquida (hidrolisado de malte) foi armazenada para etapas seguintes.

Depois deste estágio, a solução foi concentrada em um rotaevaporador à vácuo com uma temperatura de aquecimento igual a 60 °C, com o objetivo de aumentar a concentração inicial de açúcares presentes. Esta condição de operação com temperatura baixa foi escolhida para evitar a formação de compostos inibidores formados pela degradação dos açúcares em temperaturas mais altas. Após a evaporação da água, o pH do meio foi ajustado para 6,86 utilizando hidróxido de sódio (NaOH) e a solução foi centrifugada a 4 °C e 4000 rpm durante 15 minutos. Por último, realizou-se a esterilização em autoclave por 30 minutos a 111 °C a 0,5 kgf.cm⁻². A etapa de pré-tratamento foi realizada para solubilizar as frações de hemicelulose e lignina.

3.2 Microrganismos

No presente estudo, foram utilizados diferentes microrganismos para verificar o potencial de utilização do hidrolisado de malte para produção de compostos de interesse como ácido láctico, 2,3-butanodiol, entre outros. As bactérias ácido lácticas e leveduras isoladas previamente de soro de leite e grãos de kefir foram identificadas por espectrofotometria de massas, MALDI-TOF (ICBS-UFRGS), o qual capaz de identificar microrganismos isolados em meios de cultura. Esses foram identificados como: *Lactobacillus fermentum 1*, *Lactobacillus fermentum 2*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus maltaromicus* e a levedura *Candida kefir*. Os

microrganismos utilizados neste trabalho fazem parte do banco de culturas LABIO (UFRGS). *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Pantoea agglomerans BL1* e *Klebsiella pneumoniae BLh-1* foram selecionadas do banco de culturas do Bioteclab (ICTA - UFRGS), sendo as duas últimas identificadas segundo Rossi *et al.* (2011). Os estoques de microrganismos foram mantidos em meio Luria-Bertrani (LB) com 50 % de glicerol, para as bactérias e levedura e em estoque com meio MRS para as bactérias lácticas, armazenados à -20 °C para posterior uso.

3.3 Screening para produção de bioprodutos de interesse

A fim de selecionar potenciais produtores de bioprodutos de interesse, os microrganismos citados no item 3.2 foram cultivados diretamente em hidrolisado de malte diluído, em frascos Erlenmeyers de 125 mL com 60 mL de volume de trabalho incubados em agitador orbital (shaker) a 30 °C e 150 rpm por 24 horas. Em cada frasco, foi adicionado, em capela de fluxo laminar, o inóculo diretamente do estoque em glicerol. Os experimentos foram realizados em simplificada.

Após 24 horas, foi analisado o pH final das amostras e as mesmas foram centrifugadas a 4000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, o sobrenadante resultante foi filtrado em membranas de acetato de celulose com porosidade de 0,22 µm da marca Sartorius (Alemanha) para análise dos metabólicos de interesse e verificação do consumo de açúcares presentes no hidrolisado por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando Coluna Rezex RHM - Monosaccharide H+, temperatura de 80 °C e solução aquosa de ácido sulfúrico 5 mM como fase móvel com fluxo de 0,6 mL.min⁻¹.

3.4 Análise de coloração Gram

Antes de começar os ensaios de fermentação, foi feita uma análise de coloração Gram, onde as colônias foram fixadas à lâmina de vidro na chama com bico de Bunsen e, em seguida, foi aplicada a solução violeta cristal, deixando agir por 1 minuto. Após, a lâmina foi lavada com água corrente e, então, colocada a solução de lugol por 1 minuto. Em seguida, a lâmina foi lavada em água corrente e colocada uma solução de álcool:acetona e deixou-se agir por 30 segundos, após foi adicionado fucsina, e deixou-se agir por mais 30 segundos e lavadas em água corrente. Por fim, as lâminas foram colocadas em capela de fluxo para secar e analisadas em microscópio. Este é o passo de diferenciação entre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, onde as células de bactérias Gram-positivas ficam coradas de violeta-escuro e as Gram negativas ficam rosas.

Essa técnica classifica as bactérias com base no tamanho, morfologia celular, comportamento diante dos corantes e agrupamentos das células.

3.5 Ensaios de fermentação

Para ensaios de fermentação, os microrganismos que apresentaram maior potencial nos ensaios de screening foram fermentados em hidrolisado ácido concentrado. As BAL (bactérias ácido lácticas) selecionadas para os ensaios foram as bactérias *Lactobacillus maltaromicus* e *Lactobacillus plantarum*. Ambos os ensaios foram realizados em duplicata.

Para inóculo, cada microrganismo foi cultivado overnight em meio de cultura MRS líquido (composição do meio descrito na Tabela 1). Após, foi feita a leitura da densidade óptica a 600 nm em espectrofotômetro e, quando necessário, foi realizada a padronização com meio MRS líquido estéril para a densidade óptica de 1,0. Então, o meio de cultura padronizado foi centrifugado por 15 minutos, a 4 °C e 4000 rpm, retirando o sobrenadante que possivelmente continha produtos de fermentação e açúcares residuais.

Tabela 1 Composição do MRS com ajuste de pH em 6,80

| Componente | Concentração [g.L ⁻¹] |
|---------------------|-----------------------------------|
| Peptona | 10 |
| Extrato de carne | 10 |
| Extrato de levedura | 5 |
| Glicose | 20 |
| Acetato de sódio | 5 |
| Polissorbato 80 | 1 |
| Fosfato de potássio | 2 |
| Citrato de amônio | 2 |
| Sulfato de magnésio | 0,1 |
| Sulfato de manganês | 0,05 |

As células centrifugadas foram ressuspensas (diluídas) em hidrolisado estéril e inoculadas nos Erlenmeyers contendo hidrolisado concentrado estéril e ajustado a pH 6,86. O volume de inóculo foi igual a 5 % do volume do meio de fermentação. Nestes cultivos, utilizou-se Erlenmeyers de 250 mL, com volume útil de meio fermentativo de 125 mL, simulando uma condição de microaerofilia. Os Erlenmeyers foram vedados com buchas de algodão permeáveis ao oxigênio e incubados em estufa orbital com agitação de 150 rpm, a 30 °C.

A biorreação foi monitorada pela retirada de uma alíquota de 4 mL a cada 3 horas nas primeiras 12 horas de cultivo e, após, o mesmo volume foi retirado em diferentes intervalos até atingir o tempo final de cultivo que foi de 48 horas. O pH das amostras foi medido e as mesmas foram centrifugadas para posterior análise.

3.6 Análise de crescimento celular

Para a contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC), foram preparadas placas com meio sólido para acompanhar o crescimento dos microrganismos. Ao meio MRS (Tabela 1, adicionado de 15 g.L⁻¹ de ágar), foi adicionado 1,7 µL.mL⁻¹ de fluconazol para inibir o

crescimento de qualquer tipo de levedura, a fim de avaliar o crescimento das BAL *Lactobacillus maltaromicus* e *Lactobacillus plantarum*.

A metodologia utilizada para a quantificação das unidades formadoras de colônias foi o método SP-SDS, *Single Plate-Serial Dilution Spotting* (THOMAS et al., 2015). Seguiu-se o procedimento, conforme descrito abaixo:

1. Preparação do suporte e da placa de Petri (15 - 20 mL por 9 cm de diâmetro) e armazenar *overnight*;
2. Preparação da amostra;
3. Preparação de 6 diluições entre 10^{-1} até 10^{-6} com água destilada em Eppendorf de 2 mL com volume útil de 1 mL;
4. Marcação de 6 áreas na placa de Petri;
5. Aplicação de uma alíquota de 20 μ L com 10 a 12 gotas para cada diluição nas áreas marcadas;
6. Armazenamento da placa de Petri em estufa a 30 °C; e
7. Contagem das colônias são formadas em cada área de diluição da placa (contar apenas colônias quando tiver entre 6 e 60 colônias por área).

Para o plaqueamento, foi realizado uma diluição seriada para cada ponto de amostra coletada. As diluições foram realizadas até 10^{-6} e plaqueadas em meio sólido, previamente preparado, em duplicata. Cada placa foi dividida em seis quadrantes (10^1 a 10^6) e em cada quadrante foi plaqueado uma alíquota de 20 μ L da diluição correspondente, dividida em 10 a 15 microgotas. Após isso, as placas foram armazenadas em estufa, durante 72 h a 30 °C.

Para a quantificação em UFC.mL⁻¹ foi usada a equação 1.

$$\text{UFC.mL}^{-1} = \frac{N * 1000 * d}{20} \quad (1)$$

Onde:

N: número de colônias contadas

d: diluição

3.7 Metodologia analítica

Os hidrolisados foram caracterizados quanto aos teores de açúcares, ácidos orgânicos, etanol e 2,3-butanodiol. Essas análises foram determinadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando Coluna Rezex RHM - Monosaccharide H+, temperatura de 80 °C e solução aquosa de ácido sulfúrico 5 mM como fase móvel com fluxo de 0,6 mL.min⁻¹.

3.8 Cálculo dos parâmetros cinéticos

O parâmetro cinético de produtividade Q_p é descrito na equação 2.

$$Q_p = \frac{P}{t} \quad (2)$$

Sendo:

Q_p : a produtividade, em $\text{g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$;

P : quantidade de produto produzido ao fim da fermentação, em $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; e

t : o tempo de fermentação, em h.

A conversão de produto foi calculada de acordo com a Equação 3.

$$Y_{PS} = \frac{P}{S_0 - S} \quad (3)$$

Sendo:

Y_{PS} : a conversão de substrato em produto (rendimento), em $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$;

S_0 : a concentração de açúcares totais no início da fermentação, em $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$; e

S : a concentração de açúcares totais ao fim da fermentação, em $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$

4 Resultados e Discussão

4.1 Hidrolisado de bagaço de malte

O pré-tratamento do bagaço de malte com ácido diluído é responsável por separar a matriz lignina, reduzir a cristalinidade da celulose e hidrolisar os açúcares presentes na fração de hemicelulose da biomassa, liberando principalmente pentoses. A concentração média dos açúcares presente no hidrolisado obtido, logo após o processo de hidrólise se encontram na Tabela 2. Com relação à composição, o bagaço de malte apresentou maior concentração de arabinose e xilose comparado a glicose.

A presença de hexoses e pentoses no bagaço de malte torna maior o desafio da bioconversão com alta eficiência, uma vez que a maioria dos microrganismos não consegue metabolizá-los simultaneamente, pois a arabinose e a xilose são metabolizados através da via pentose-fosfato, enquanto a glicose é metabolizada através da glicólise.

Diversos microrganismos são capazes de fermentar a glicose, mostrando preferência pela via glicolítica ao invés da via pentose-fosfato, onde são metabolizadas as pentoses.

Tabela 2 Composição de açúcares presentes no hidrolisado diluído e concentrado

| Açúcar | Hidrolisado Diluído | Hidrolisado Concentrado |
|--------------------------------|---------------------|-------------------------|
| Glicose [g.L ⁻¹] | 1,212 | 4,120 |
| Xilose [g.L ⁻¹] | 2,071 | 7,043 |
| Arabinose [g.L ⁻¹] | 2,642 | 8,982 |

4.2 Screening dos microrganismos

Na Figura 9, estão apresentados os valores de açúcares contidos no hidrolisado de malte diluído, além dos produtos obtidos na fermentação com os diversos microrganismos testados e o valor de açúcares remanescente após a fermentação.

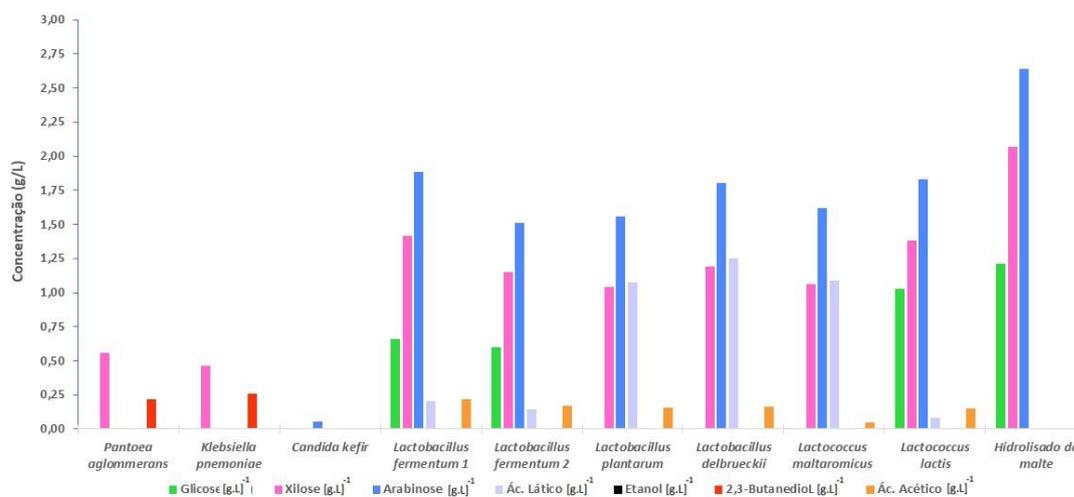


Figura 9 Screening dos microrganismos selecionados e produtos formados

Como mostrado na Figura 9, os microrganismos que mais produziram ácido láctico foram as bactérias *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii* e *Lactobacillus maltaromicus*, evidenciando o consumo total da glicose para as três BAL. Dentre as três BAL citadas, *L. delbrueckii* apresentou o menor consumo de xilose com 42 %, sendo que as BAL *L. maltaromicus* e *L. plantarum* apresentaram consumos de 49 e 50 %, respectivamente. Com relação à arabinose, o maior consumo foi verificado para *L. plantarum* com 41 %, seguida de *L. maltaromicus* com 39 % e *L. delbrueckii* com 32 %.

O ácido acético foi produzido, porém em menor escala, por todos os *Lactobacillus* e *Lactococcus* testados. As outras BAL testadas apresentaram baixo consumo dos açúcares, refletindo numa produção abaixo de 1 g.L⁻¹ para ácido láctico. A levedura *C. kefir*, testada neste trabalho para possível produção de etanol, apresentou consumo quase completo dos açúcares, sem produção detectável de produtos de interesse.

As bactérias *Pantoea agglomerans* BL1 e *Klebsiella pneumoniae* BLh-1 foram as únicas que produziram 2,3-butanodiol, como já evidenciado em trabalhos anteriores com hidrolisado de casca de soja (Machado, 2020; Ourique et al., 2020). Cabe ressaltar a completa utilização de glicose e arabinose para as bactérias mostrando seu potencial na utilização dos açúcares presentes no hidrolisado. A xilose também foi quase completamente consumida, porém a produção de 2,3-butanodiol mostrou-se baixa, comparado a outros trabalhos. Cortivo et al. (2018), utilizando hidrolisado de casca de soja ácido e enzimático, a temperatura de 30 °C, com as duas linhagens de bactérias, *Klebsiella pneumoniae* BLh-1 e *Pantoea agglomerans* BL1, obtiveram valores de 2,3-butanodiol de 21,9 g.L⁻¹ e 17,9 g.L⁻¹, respectivamente.

Com relação aos valores de pH (Figura 10) analisados durante a fermentação dos microrganismos testados na etapa de *screening*, estes estão em concordância com valores de produção de ácidos orgânicos apresentados na Figura 9. Observa-se que os microrganismos que mais produziram ácido láctico e ácido acético atingiram um valor final de pH menor, que é o caso das bactérias *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii* e *Lactobacillus maltaromicus*, seguido pelas bactérias que produziram 2,3-butanodiol, *Pantoea agglomerans* BL1 e *Klebsiella pneumoniae* BLh-1.

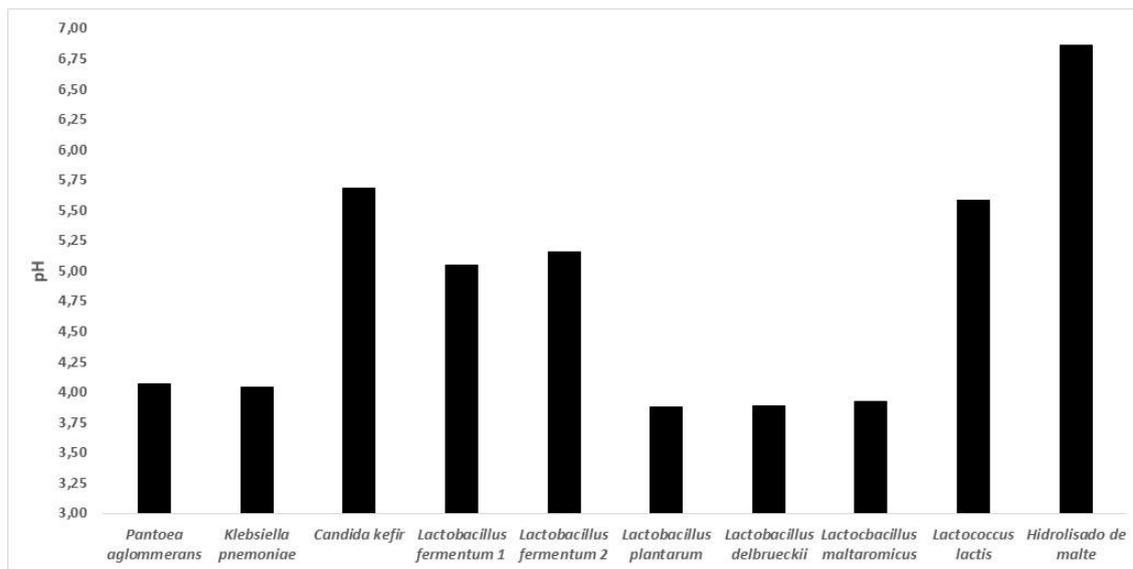


Figura 10 Análise de pH dos hidrolisados

Desta forma, diante da análise de formação de produtos e consumo dos açúcares presentes no hidrolisado de bagaço de malte, foram escolhidas para os próximos experimentos, as bactérias *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus maltaromicus*, pois produziram maior quantidade de ácido láctico e apresentaram maior consumo das pentoses, além de consumo de glicose.

Cabe mencionar que se esperava uma maior produção de 2,3-butanodiol em bagaço de malte por experiências prévias com outros hidrolisados lignocelulósicos (casca de soja, casca de arroz, entre outros) (CASSALES *et al.*, 2011; HICKERT *et al.*, 2014). Uma possível explicação para a baixa produção pode estar relacionada à pressão osmótica, não medida neste trabalho. Sabe-se que durante o processo de hidrólise ácida, a pressão osmótica é diretamente relacionada com a atividade de água no meio, sendo esta inversamente proporcional à concentração de solutos no meio, ou seja, a pressão osmótica aumenta quanto maior for a concentração de açúcares do meio, afetando diretamente na formação de produtos (Hickert *et al.*, 2014). Outra possibilidade é a presença de compostos tóxicos como furfural e hidroximetilfurfural, cuja presença já foi descrita em hidrolisados de casca de soja (CASSALES *et al.*, 2011; Machado, 2020), que podem estar em concentrações elevadas no hidrolisado utilizado e que também não foram quantificados neste trabalho.

4.3 Análise de Coloração Gram

As bactérias selecionadas foram visualizadas em microscópio óptico em lente objetiva de 1000 x, após coloração de Gram. Pela figura 11, podemos concluir que ambas são bactérias que apresentam forma de bacilos Gram positivas.

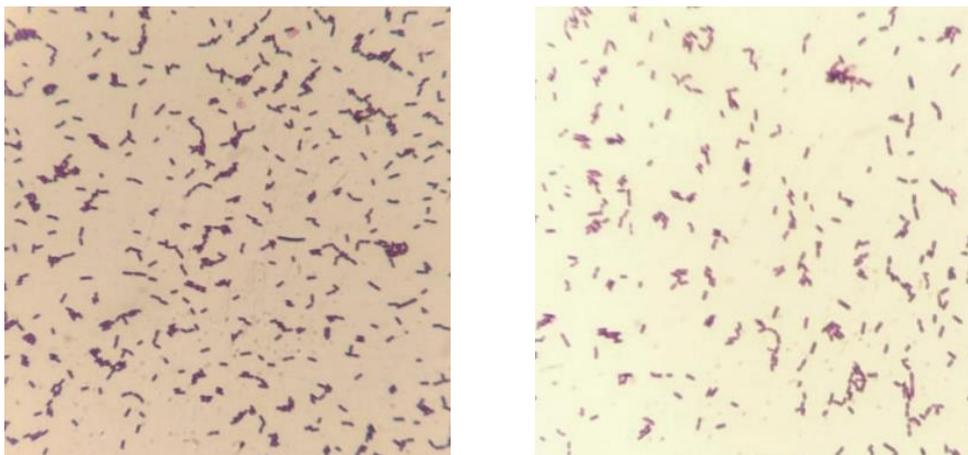


Figura 11 *Lactobacillus plantarum* à esquerda e *Lactobacillus maltaromicus* à direita (Imagem autoral)

L. plantarum é uma BAL facultativa heterofermentativa, Gram positiva com forma de bastonete curto, não móvel, catalase negativa, não formadora de esporos e, além disso, é extremamente tolerante a várias condições adversas e a ácidos. Como uma espécie de BAL, o *Lactobacillus plantarum* necessita de um carboidrato fermentável como fonte de energia para produzir ácido lático como principal produto (AL-TAWAHA et al., 2018). De forma similar, *L. maltaromicus* é uma BAL Gram positiva com forma de bastonete.

4.4 Cinética de fermentação das BAL

O estudo da cinética fermentativa é um passo importante para descrever o comportamento e parâmetros cinéticos das BAL selecionadas. Conforme descrito no capítulo 3, a fim de avaliar o consumo de açúcares, formação de ácido lático e outros produtos de fermentação, foram realizados experimentos em batelada para ambas as BAL selecionadas no item 4.2. Todos os experimentos foram realizados em duplicata e os dados são mostrados nas Figuras 12 e 13, respectivamente.

Analisando a Figura 12, para a cinética fermentativa do *Lactobacillus maltaromicus*, nota-se que a produção de ácido lático foi baixa ao longo de 48 horas de batelada, com uma produtividade de $0,01 \text{ g.L}^{-1}$ e a produção do ácido acético ocorreu entre 9 e 12 horas, justificando a diminuição do pH do meio. Sobre os açúcares, pode-se concluir que as três fontes distintas de carbono não foram praticamente consumidas, com exceção da glicose que teve 10 % de consumo.

A baixa produção de ácido lático comparada ao ensaio de *screening* pode estar relacionada à elevada pressão osmótica do meio e à possível presença de substâncias inibitórias no hidrolisado, já que esta etapa foi realizada com o hidrolisado de forma concentrada onde a quantidade total de açúcares totais foi de $13,53 \text{ g.L}^{-1}$ comparados ao $5,92 \text{ g.L}^{-1}$ do hidrolisado diluído, utilizado na etapa de *screening*.

Estudos usando resíduos lignocelulósicos relatam que um dos principais problemas atribuídos aos processos de tratamentos da matéria prima, são os compostos produzidos

durante esses processos. Dentre os diversos processos de hidrólise empregados, a hidrólise ácida configura como o mais antigo e mais bem estabelecido processo, sendo que, juntamente com a explosão a vapor, é utilizada hoje em escala piloto. O pré-tratamento com ácidos diluídos envolve o uso de ácido sulfúrico, nítrico ou clorídrico e tem sido citado como o melhor tipo de pré-tratamento para resíduos agroindustriais (SILVERSTEIN *et al.*, 2007). Porém, alguns compostos como HMF, produto de degradação por hexoses, ácidos carboxílicos alifáticos, tais como o ácido fórmico, são relacionados a degradação final dos monossacarídeos e estão relacionados a inibição do crescimento microbiano e formação de produtos (OURIQUE *et al.*, 2020, Machado, 2020).

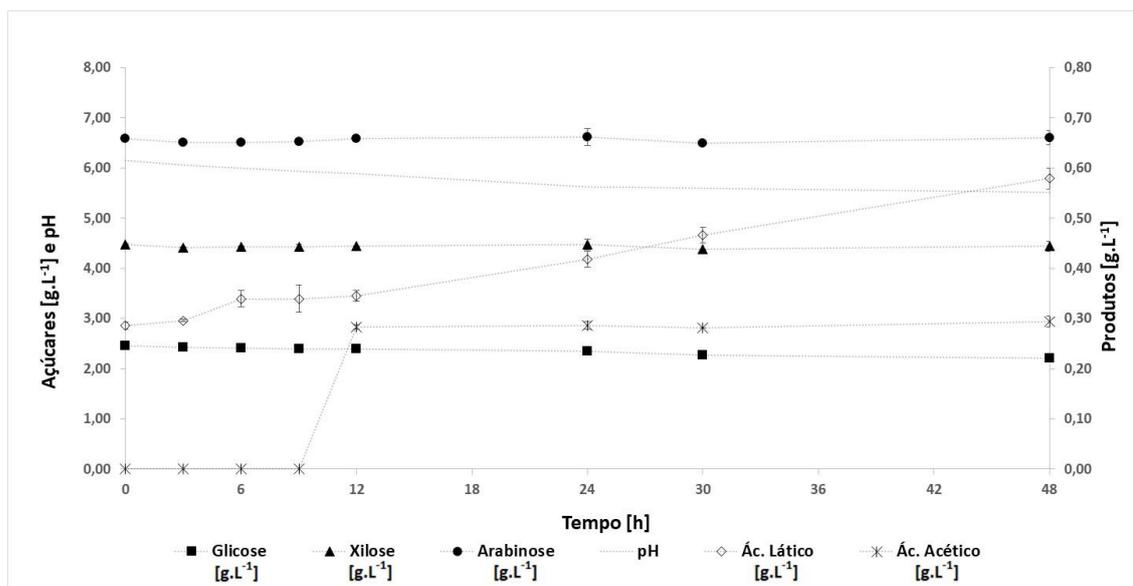


Figura 12 Estudo de reação cinética da *Lactobacillus maltaromicus* com pH inicial de 6,16 a 30 °C e 150 rpm

Já analisando a Figura 13, da mesma forma que anteriormente, a concentração de ácido láctico a partir do *Lactobacillus plantarum* aumenta com o tempo de forma praticamente linear ao longo das 48 horas de estudo com uma produtividade de $0,06 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ e uma conversão de $1,79 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$. O ácido acético, por outro lado, não foi produzido, nem os outros açúcares presentes consumidos.

Como o ácido láctico é produzido em uma quantidade maior, o pH diminui rapidamente no cultivo de *Lactobacillus plantarum* quando comparado com o de *Lactobacillus maltaromicus*.

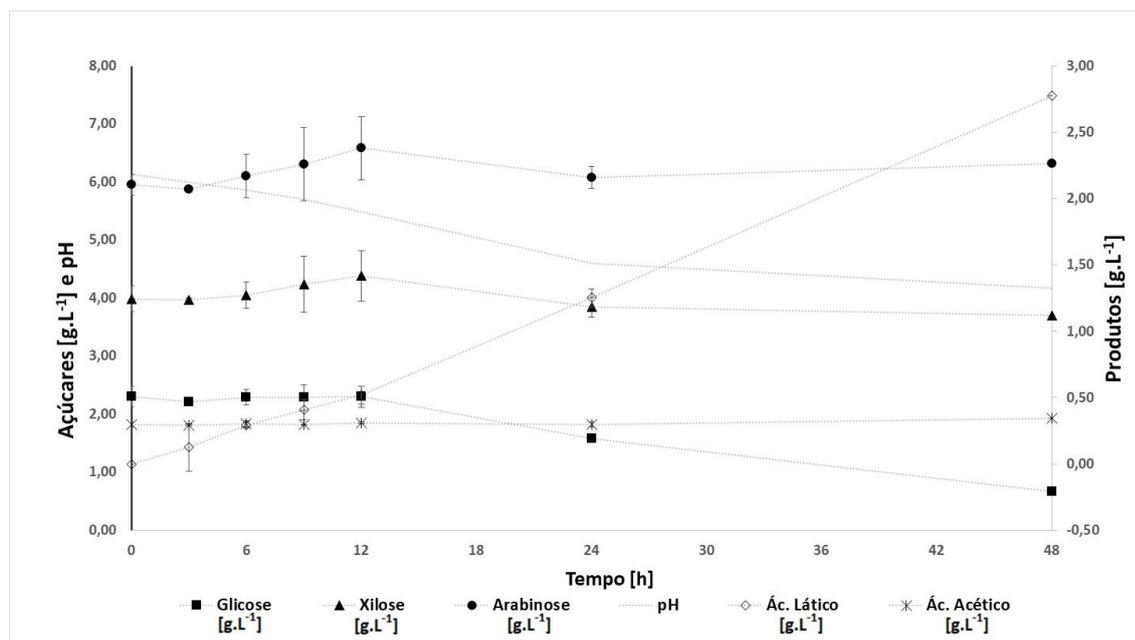


Figura 13 Estudo de reação cinética da *Lactobacillus plantarum* com pH inicial de 6,13 a 30°C e 150 rpm

Segundo WEE *et al* (2006), a quantidade de ácido láctico produzido varia conforme a espécie de bactéria utilizada. Na Tabela 3, é mostrado alguns parâmetros cinéticos de bactérias produtoras de ácido láctico encontrados na literatura. Como é visto, a produtividade obtida no presente trabalho é baixa comparada com outras bactérias ou até mesmo com a própria *L. plantarum*, porém a conversão mostrou ser muito alta, tornando possível que haja algum oligossacarídeo presente no meio que possa ter sido utilizado como fonte de carbono, porém que não foi possível quantificar.

Tabela 3 Bactérias produtoras de ácido láctico e respectivos parâmetros cinéticos (Fonte: WEE *et al.*, 2006)

| Bactéria | Produção de ácido láctico [g.L ⁻¹] | Yps [g.g ⁻¹] | Qp [g.(L.h) ⁻¹] |
|----------------------------------|--|--------------------------|-----------------------------|
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 144,0 | 0,96 | 5,1 |
| <i>Lactobacillus delbrueckii</i> | 90,0 | 0,97 | 3,8 |
| <i>Lactococcus lactis</i> | 90,0 | 0,76 | 1,6 |
| <i>Lactobacillus casei</i> | 82,0 | 0,91 | 5,6 |
| <i>Lactobacillus amylophilus</i> | 76,2 | 0,70 | 0,8 |
| <i>Lactobacillus rhamnosus</i> | 67,0 | 0,84 | 2,5 |
| <i>Lactobacillus helveticus</i> | 65,5 | 0,66 | 2,7 |
| <i>Lactobacillus plantarum</i> | 41,0 | 0,97 | 1,0 |
| <i>Lactobacillus bulgaricus</i> | 38,7 | 0,90 | 3,5 |
| <i>Lactobacillus pentosus</i> | 21,8 | 0,77 | 0,8 |

A Tabela 4 apresenta o consumo de açúcares, a produção de bioprodutos obtidos e os parâmetros cinéticos calculados. É possível observar que maiores valores de produtividade e rendimento são obtidos utilizando o *Lactobacillus plantarum* ($0,06 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ e $1,79 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$), em relação ao *Lactobacillus maltaromicus* ($0,01 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$ e $1,09 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$).

Nota-se também que ambas as bactérias apresentaram uma preferência muito maior no consumo de glicose frente a xilose e a arabinose, diferente de quando analisado na etapa de *screening*, na qual foi notado um consumo maior das pentoses. Isso deve ser explicado pela pressão osmótica do meio que está mais concentrado quando comparado com a etapa anterior.

Tabela 4 Consumo de glicose e produção de ácido lático na fermentação do meio hidrolisado de bagaço concentrado em 48 horas de produção

| Microrganismo | Glicose consumida [%] | Produção de ácido lático [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$] | Yps [$\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$] | Qp [$\text{g} \cdot (\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$] |
|------------------------|-----------------------|---|--|--|
| <i>L. maltaromicus</i> | 10,04% | 0,58 | 1,09 | 0,01 |
| <i>L. plantarum</i> | 70,81% | 2,81 | 1,79 | 0,06 |

4.5 Análise de Crescimento Celular

A análise do crescimento celular foi acompanhada através do método de plaqueamento em meio MRS sólido conforme descrito na seção 3.6. Um exemplo do crescimento das colônias de *L. plantarum* e *L. maltaromicus* é apresentado nas Figuras 14 e 15.

Na Figura 14, na placa da esquerda é possível contar, segundo a metodologia descrita, apenas na região de diluição igual a 10^{-4} , cujo apresenta 25 colônias distintas. Da mesma forma, na placa à direita, é possível contabilizar também somente na área de diluição igual a 10^{-4} , contabilizando 22 colônias.

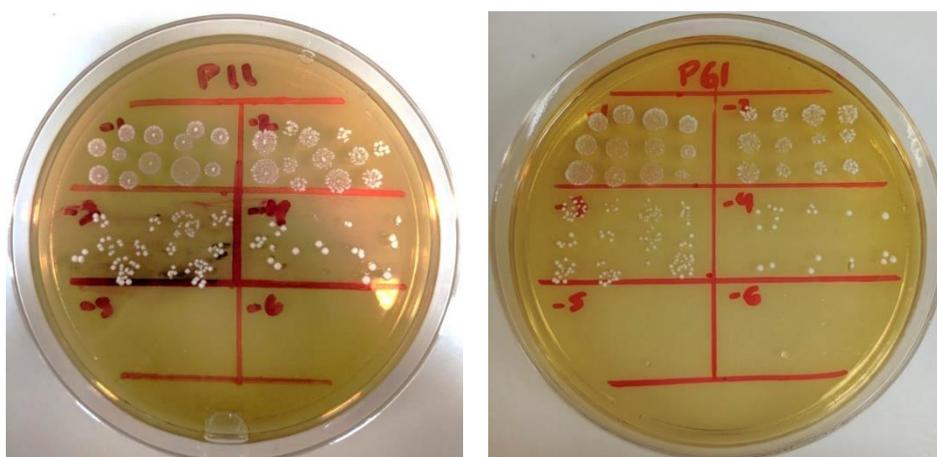


Figura 14 Análise de crescimento celular de *Lactobacillus plantarum* depois de 3 horas de fermentação à esquerda e após 30 horas à direita (Foto autoral)

De uma forma análoga, na Figura 15, pode-se contabilizar 46 colônias na diluição igual a 10^{-3} e 30 colônias na diluição igual a 10^{-4} na imagem à esquerda. Já na placa à direita, conta-se apenas 14 colônias distintas na região de diluição igual a 10^{-3} .

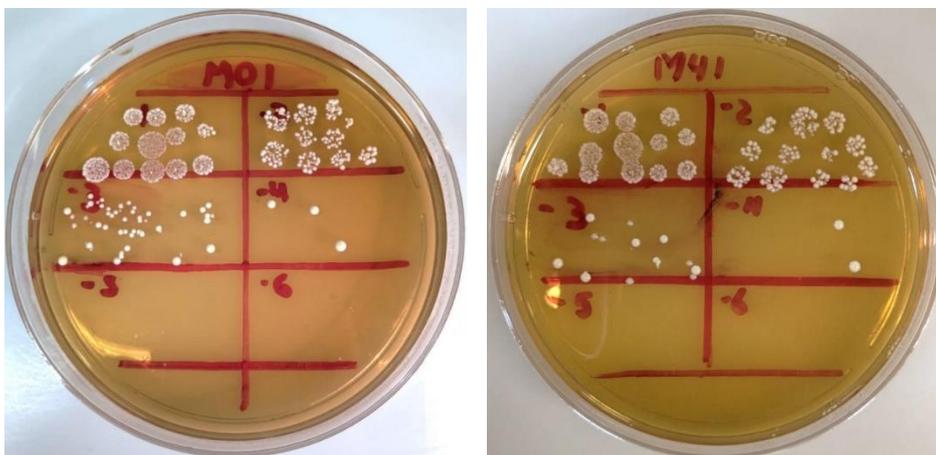


Figura 15 Análise de crescimento celular de *Lactobacillus maltaromicus* no ponto inicial da fermentação à esquerda e após 12 horas à direita (Foto autoral)

Nas Figuras 16 e 17, é apresentado o crescimento celular em função do tempo, junto com as concentrações do açúcar mais consumido pelas bactérias, a glicose, e o produto mais produzido, o ácido lático.

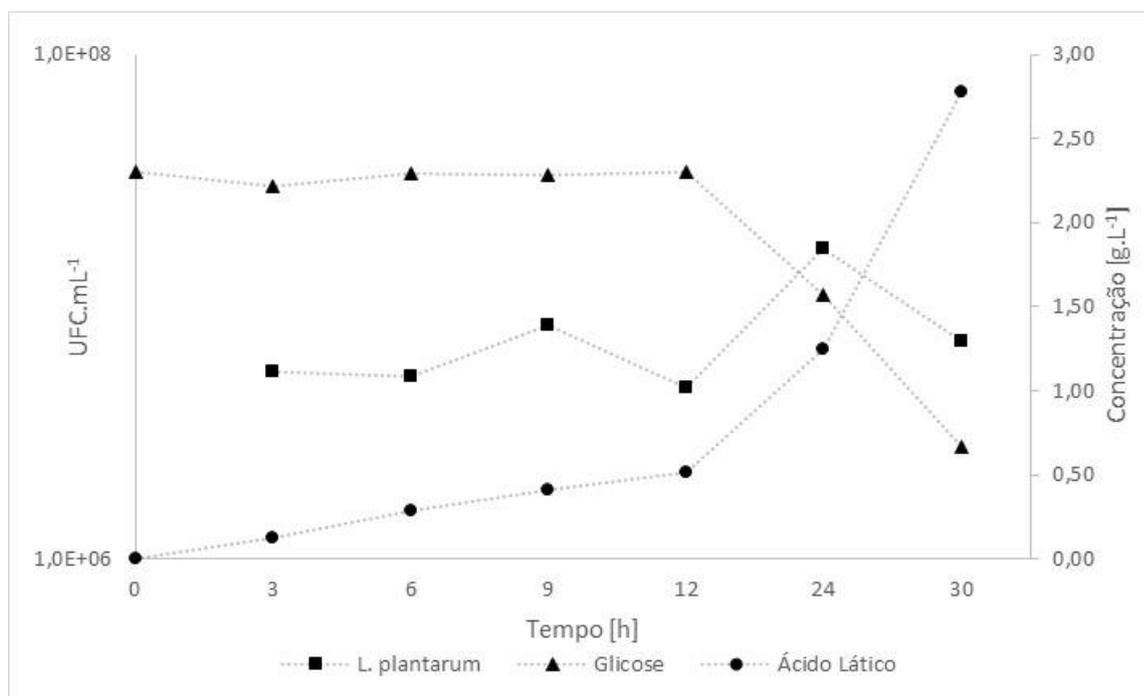


Figura 16 Cinética de células viáveis (UFC/mL), consumo de glicose (g.L⁻¹) e produção de ácido lático (g.L⁻¹) pela bactéria *Lactobacillus plantarum*

Observa-se que a produção de ácido lático pela *Lactobacillus plantarum* acompanha a curva de crescimento celular até 24 horas de crescimento, apresentando o mesmo comportamento e, portanto, pode-se concluir que o ácido lático é o metabólito primário neste caso.

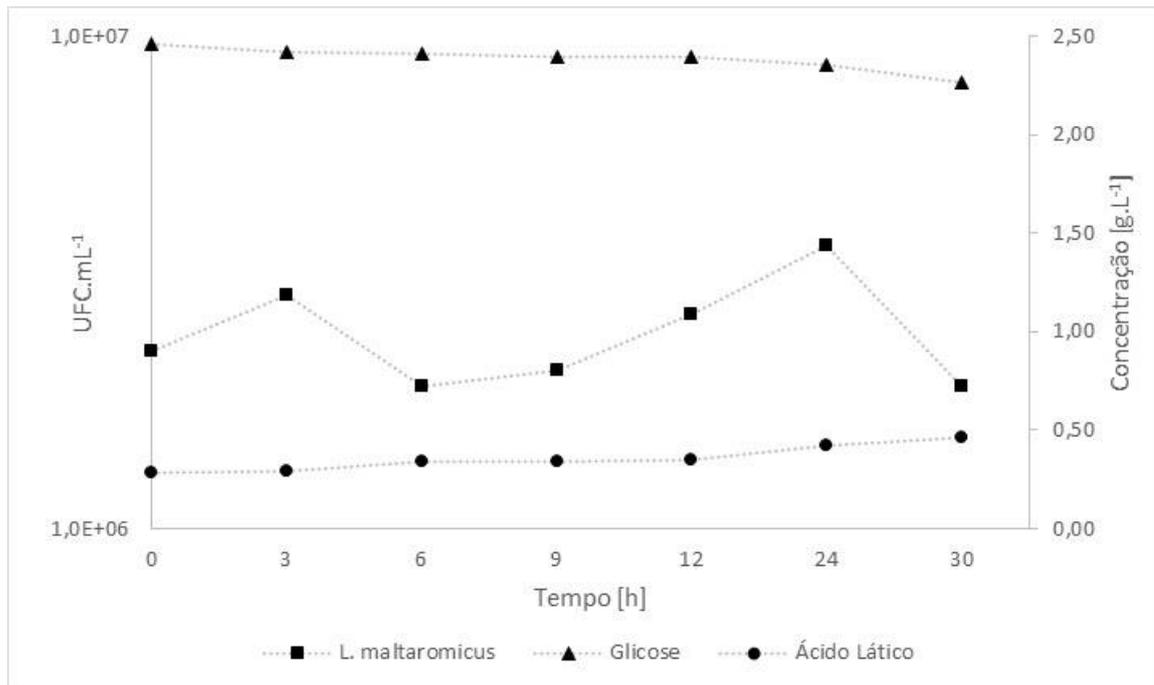


Figura 17 Cinética de células viáveis (UFC/mL), consumo de glicose (g.L⁻¹) e produção de ácido láctico (g.L⁻¹) pela bactéria *Lactobacillus maltaromicus*

Já sobre o crescimento das colônias de *Lactobacillus maltaromicus*, não houve um crescimento muito acentuado e, além disso, há bastante variação nos dados apresentados.

5 Conclusões e Trabalhos Futuros

É possível concluir que tanto a *Pantoea agglomerans* e a *Klebsiella pneumoniae* são microrganismos capazes de produzir 2,3-butanodiol e, também, de consumir toda glicose e arabinose, além de mais da metade de xilose, presentes no hidrolisado de malte diluído.

Nota-se que a obtenção de bioprodutos no hidrolisado de malte diluído foi maior que no hidrolisado de malte concentrado. É possível que isso se dê ao fato da pressão osmótica no meio concentrado ter inibido o crescimento microbiano, dificultando a conversão de bioprodutos.

A produção de ácido láctico a partir de hidrolisado de bagaço de malte se mostrou viável, pois apresenta uma conversão alta, porém é uma produção lenta devido a sua produtividade ter sido baixa, podendo levar mais de 36 horas para se obter uma concentração maior que 2,0 g.L⁻¹.

Os microrganismos não foram capazes de consumir xilose e arabinose, porém a *Lactobacillus plantarum* demonstrou ser bastante eficiente, consumindo mais de 70% da glicose presente no meio.

Para trabalhos futuros, pretende-se estudar melhor a hidrólise de malte em relação a sua composição, pois acredita-se que outros metabólitos possam estar presentes, afetando diretamente a produção de ácido láctico. Atualmente, já existem ensaios metabolômicos sendo realizados para analisar melhor os compostos presentes nos hidrolisados, sendo técnicas cromatográficas diferentes das utilizadas hoje e, assim, podendo detectar compostos que não se consegue identificar neste primeiro momento.

A análise de metabólitos inibitórios e avaliação da pressão osmótica do meio são essenciais para melhor entendimento do processo. Outra possibilidade seria o estudo de uma suplementação nutritiva no meio ou então mudar as condições operacionais, tais como temperatura e pH. Por fim, haveria também a possibilidade de estudar um microrganismo diferente, por exemplo a *Lactobacillus delbrueckii* que teve um desempenho bom durante a etapa de *screening*.

Finalmente, seria de grande importância científica e tecnológica testar a imobilização das células dos microrganismos em alginato de sódio com o intuito de minimizar efeitos inibitórios e verificar em quantos ciclos é possível reaproveitar essas esferas de imobilização para a obtenção de bioprodutos.

REFERÊNCIAS

AL-TAWAHA, A. R. *et al.* Potential benefits of *Lactobacillus plantarum* as probiotic and its advantages in human health and industrial applications: A review. **Adv. Environ. Biol**, v. 12, p. 16-27, 2018.

BASTOS, V. D. Etanol, álcoolquímica e biorrefinarias. **Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social**, 2007.

CAMARGO, S. K. C. A. Produção de bioetanol via hidrólise ácida de *Eucalyptus urograndis* utilizando os conceitos de uma biorrefinaria: abordagem teórico experimental. **Universidade Estadual Paulista**, 2020.

CASSALES, A. *et al.* Optimization of soybean hull acid hydrolysis and its characterization as a potential substrate for bioprocessing. **Biomass and Bioenergy**, v. 35, n. 11, p. 4675–4683, 2011.

CervBrasil. Dados do setor 2018. Disponível em: http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/dados-do-setor/. Acesso em: 12 ago. 2022.

CervBrasil. Anuário da Cerveja 2020. Disponível em: http://www.cervbrasil.org.br/novo_site/wp-content/uploads/2021/04/anuariocerveja2.pdf. Acesso em: 10 ago. 2022.

CETRARIU, A.; DABIJA, A. Brewer's spent grains: Possibilities of valorization, a review. **Applied Sciences**, v. 10, n. 16, p. 5619, 2020.

DA SILVA, C. C. *et al.* Utilização do bagaço de malte da indústria cervejeira como substrato para produção de pectinase por. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 4, n. 4, p. 5042–5060, 2021.

DE ASSIS, H. M. *et al.* Cerveja artesanal: componentes e processos produtivos. **Inovação, gestão e sustentabilidade na agroindústria**. Instituto Internacional Despertando Vocações, p. 113–132, 2021.

DE OLIVEIRA, A. C. S.; BORGES, S. V. Poli (Ácido Lático) Aplicado para Embalagens de Alimentos: Uma Revisão. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 15, n. 1 p. 1-10, 2020.

DE SOUZA, M. J. S. Desenvolvimento de uma cerveja artesanal com adição de resíduo de pão francês e extrato de seriguela (*Spondias purpúrea* L). **Universidade Federal do Rio Grande do Norte**, 2021.

EL-SHESHTAWY, H. S. *et al.* Optimization of lactic acid production from agro-industrial wastes produced by *Kosakonia cowanii*. **Current Research in Green and Sustainable Chemistry**, v. 5, p. 100228, 2022.

FERNANDES, M. *et al.* Produção de ácido láctico por *Lactobacillus delbrueckii* em hidrolisado celulósico de bagaço de malte: efeito do nível de inóculo. **Universidade de São Paulo**, 2007.

FERREIRA, A. D. Utilização da levedura *Pichia stipitis* UFMG-IMH 43.2 para obtenção de etanol em hidrolisado hemicelulósico de bagaço de cana-de-açúcar. **Universidade de São Paulo**, 2010.

FRANCISKI, M. A. Obtenção e caracterização de carvão ativado a partir de bagaço de malte oriundo de cervejarias para utilização como adsorvente do corante azul de metileno. **Universidade Federal de Santa Maria**, 2018.

FRANCISKIEVICZ, A. C. *et al.* Reaproveitamento do bagaço de malte na biossorção do corante têxtil neolan preto WA. **Revista Tecnologia e Sociedade**, v. 16, n. 41, p. 15-30, 2020.

GARCIA, A. D. Produção fermentativa de 2, 3-butanodiol a partir de hidrolisado hemicelulósico de eucalipto. **Faculdade de Engenharia Química de Lorena**, 2006.

GOMES, R. H. Utilização do bagaço de malte como ração animal. **Fundação Educacional do Município de Assis**, 2010.

GURAGAIN, Y. N.; VADLANI, P. V. 2,3-Butanediol production using *Klebsiella oxytoca* ATCC 8724: Evaluation of biomass derived sugars and fed-batch fermentation process. **Process Biochemistry**, v. 58, p. 25-34, 2017.

HICKERT, L. R. Bioconversão de hidrolisados de casca de arroz e soja em etanol e xilitol por leveduras. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 2014.

HONORATO, T. L. *et al.* Produção de ácido láctico e dextrana utilizando suco de caju como substrato. **Food Science and Technology**, v. 27, p. 254-258, 2007.

JI, Xiao-Jun; HUANG, He; OUYANG, Ping-Kai. Microbial 2, 3-butanediol production: a state-of-the-art review. **Biotechnology advances**, v. 29, n. 3, p. 351-364, 2011.

JUNIOR, S. V. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: uma abordagem sustentável. **Embrapa Agroenergia**, 2020.

LAUFFER, O. L. Produção biotecnológica de ácido láctico a partir de diferentes fontes de carbono. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 2019.

LIMA, T. C. *et al.* Estudo da produção de bioetanol a partir do bagaço de malte. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 1, p. 595-600, 2014.

LIU, S. Q. Practical implications of lactate and pyruvate metabolism by lactic acid bacteria in food and beverage fermentations. **International journal of food microbiology**, v. 83, n. 2, p. 115-131, 2003.

LOPES, A. R. Produção de ácido láctico por lactobacilos em diferentes meios de cultivo. **Universidade Estadual Paulista**, 2008.

LOPES, A. M. C. Pré-tratamento de biomassa lignocelulósica com líquidos iônicos. **Universidade de Aveiro**, 2012.

LOURENÇON, T. V.; MAGALHÃES, W. L. E. Lignina frente a fungos apodrecedores de madeira. **Embrapa Florestas**, 2020.

MACHADO, J. Produção biotecnológica de 2,3-butanodiol a partir de hidrolisados de casca de soja. Trabalho de Conclusão de Curso. **Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul**, 2018.

MACHADO, J. Otimização da produção de ácido láctico em biorreatores por *Lactobacillus plantarum* BLO11 em hidrolisados de casca de soja. **Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul**, 2020.

MARGARITES, A. C. F. Síntese de carboidratos por microalgas e produção de bioetanol. **Universidade Federal do Rio Grande**, 2014.

MARTINEZ, F. A. C. *et al.* Lactic acid properties, applications and production: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 30, n. 1, p. 70-83, 2013.

MASSARDI, M. M. *et al.* Caracterização química do bagaço de malte e avaliação do seu potencial para obtenção de produtos de valor agregado. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 6, n. 1, p. 0083–0091, 2020.

MATTOS, C. Desenvolvimento de um pão fonte de fibras a partir do bagaço de malte. **Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul**, 2010.

MENDES, B. S. S. N. Síntese do Poli (ácido láctico) por policondensação direta utilizando um planejamento fatorial. **Universidade Federal do Rio Grande do Norte**, 2013.

MENDONÇA, A. A. Identificação e caracterização dos genes de resistência a antimicrobiano na bactéria *Lactobacillus vini*. **Universidade Federal de Pernambuco**, 2014.

MONTIPÓ, S. Produção de ácido láctico a partir da casca de arroz. **Universidade Federal de Santa Maria**, 2012.

MUSSATTO, S. I. *et al.* Efeito da concentração inicial de xilose na produção de xilitol a partir de hidrolisado de bagaço de malte. **VIII Encontro Latino-Americano de Iniciação Científica, São José dos Campos/SP. Anais/CD-ROM de trabalhos completos**, p. 527-530, 2004.

NASCIMENTO, C. S. Prospecção de produtos inovadores com a utilização do bagaço de malte na fabricação de gelatos. **Universidade Federal de Alagoas, 2020.**

OURIQUE, L. J. *et al.* Bioreactor production of 2, 3-butanediol by *Pantoea agglomerans* using soybean hull acid hydrolysate as substrate. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 43, n. 9, p. 1689-1701, 2020.

PABBATHI, N. P. P. *et al.* Brewer's spent grains-based biorefineries: A critical review. **Fuel**, v. 317, p. 123435, 2022.

PEREIRA, N. T. Produção de Ácido Lático com Resíduos Agroindustriais: Uma Revisão da Literatura. **Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2019.**

RECH, K. P. M.; ZORZAN, V. Aproveitamento de resíduos da indústria cervejeira na elaboração de cupcake. **Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2017.**

RÊGO, P. S.; BRITO, J. G. L. Produção E Caracterização De Farinha De Bagaço De Malte A Partir De Resíduo Cervejeiro. **Revista Brasileira de Agrotecnologia**, v. 11, n. 2, p. 958–963, 2021.

ROSSI, D. M. *et al.* Comparison of different pretreatment methods for hydrogen production using environmental microbial consortia on residual glycerol from biodiesel. **International Journal of Hydrogen Energy**, v. 36, n. 8, p. 4814-4819, 2011.

SANTOS, R. S. Produção conjunta de 1, 3-Propanodiol e 2, 3-Butanodiol por *Klebsiella pneumoniae* a partir de glicerina residual proveniente da fabricação de biodiesel. **Universidade de São Paulo, 2012.**

SILVA, A. A. Produção, caracterização físico-química e análise sensorial de cerveja artesanal de trigo adicionada de polpa e casca de seriguela (*Spondias purpurea L.*) e casca de laranja (*Citrus sinensis L.*). **Universidade Federal do Ceará, 2018.**

SILVERSTEIN, R. A. *et al.* A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. **Bioresource Technology**, v. 98, n. 16, p. 3000–3011, 2007.

SOUZA, É. L. Produção de ácido lático empregando matérias primas alternativas. **Universidade Federal Fluminense, 2016.**

THOMAS, Pious *et al.* Optimization of single plate-serial dilution spotting (SP-SDS) with sample anchoring as an assured method for bacterial and yeast cfu enumeration and single colony isolation from diverse samples. **Biotechnology Reports**, v. 8, p. 45-55, 2015.

WANG, Y. *et al.* Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects, and limits. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 119, n. 1, p. 10-18, 2015.

WEE, Y.-J. *et al.* Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 163-172, 2006.