

Maracanã

Ciências biológicas com habilitação em
biotecnologia

Ana Carolina de Souza Pereira

Avaliação da
imobilização de
bactérias lácticas em
bagaço de malte

ANA CAROLINA DE SOUZA PEREIRA

**Avaliação da imobilização de bactérias lácticas em bagaço de
malte**

Trabalho de conclusão de curso, apresentado como requisito parcial a obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas com habilitação em biotecnologia pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro.

Orientador: Thiago Rocha dos Santos Mathias
Supervisor: Verônica Ferreira Melo

**Rio de Janeiro,
2019**

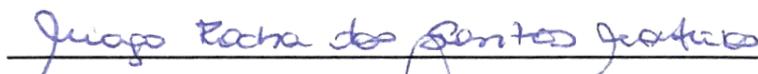
ANA CAROLINA DE SOUZA PEREIRA

Avaliação da imobilização de bactérias lácticas em bagaço de malte

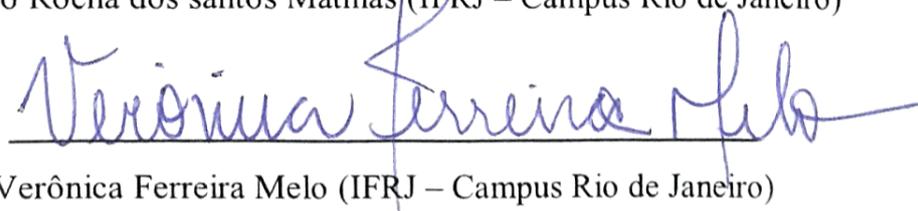
Trabalho de conclusão de curso, apresentado como requisito parcial a obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas com habilitação em biotecnologia pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro.

Orientador: Thiago Rocha dos Santos Mathias
Supervisor: Verônica Ferreira Melo

Aprovado pela banca examinadora em junho de 2019



Thiago Rocha dos Santos Mathias (IFRJ – Campus Rio de Janeiro)



Verônica Ferreira Melo (IFRJ – Campus Rio de Janeiro)



Lizeth Yuliana Acevedo Jaramillo (Escola de Química/ UFRJ)

Aos meus avós, José e Zélia, que não puderam estudar, mas
que lutaram para que essa oportunidade fosse dada aos seus
filhos e netos.

Dedico.

Agradecimentos

A minha jornada pela graduação foi extensa e bem difícil, mas eu sou eternamente grata por tudo que aconteceu comigo durante esse tempo. Conheci pessoas que quero levar para a vida, pude ter experiências únicas, pude conhecer e aprender com todos os tipos de gente, pude ter o privilégio de ser ensinada por educadores maravilhosos, que mudaram minha vida. Eu sou extremamente grata por todo conhecimento apreendido e eu tenho muito orgulho do ser humano que me tornei. Por esses motivos, preciso agradecer especialmente aqueles que mudaram minha história e estiveram comigo por todo esse tempo.

Agradeço primeiramente a Deus, por estar sempre comigo, por ser Aquele que me sustenta e sempre sustentou.

Aos meus pais, Izabel e Valfredo, por serem exemplos para mim, por terem construído uma base para que eu pudesse crescer. Agradeço por sempre estarem do meu lado, mesmo não concordando com todas as escolhas que eu fiz.

Ao laboratório em que pude realizar esse trabalho, eu não tenho como expressar toda minha gratidão por todos. Obrigada por terem me mostrado que é possível trabalhar em um ambiente agradável, obrigada por sempre me contaminar com a energia de vocês, por sempre melhorar o humor de todos que passam por ele, por serem exemplos de profissionais, por lutarem pelos nossos direitos. Verônica, Anderson, José Ricardo e a todos os monitores, em especial a Sarah, e estudantes, obrigada Paulo, que aliviaram o estresse do dia a dia e que me ajudaram a realizar os experimentos.

Ao Thiago, uma vez li que ser luz não é sobre brilhar, mas é sobre iluminar caminhos, assim que li essa frase, eu pensei logo em você. Eu não tenho como agradecer a você. Obrigada por ter aceitado me orientar durante o TCC e por ter sido um real orientador, me ajudando e dando todo o incentivo para que eu pudesse crescer.

Ao meu namorado, Victor, obrigada por ter me ajudado com o trabalho, por ter aguentado a alergia aos meus gatos, a asma e a bronquite só para ficar do meu lado enquanto eu escrevia. Obrigada por sempre ter me dado um apoio quando eu precisei e por sempre acreditar em mim. Obrigada por ter me mostrado que um relacionamento não precisa ser sofrido. Eu te amo muito. Obrigada Tinder por ter nos juntado.

A Tainan, ser humana que conheci no início da graduação, não foi amor à primeira vista, mas é um amor para toda a vida. Amiga, obrigada por ser maravilhosa e sempre me ajudar. Eu sinto muito orgulho de você e do que está se tornando e fico muito feliz por estar fazendo parte dessa jornada. Obrigada por tudo, miga, amo você.

Ao Laion, amor da minha vida, a graduação valeu só por ter conhecido você. Você é um amigo maravilhoso, que mesmo longe, sempre está presente. Obrigada pela ajuda com o TCC, por ter me ajudado a sair do zero e produzir algo.

Aos meus amigos que o IFRJ me trouxe, Quintas, Igor, Ronald, Maria, Leonardo e Letícia, eu amo demais vocês, vocês foram importantíssimos nessa jornada. Obrigada por todos os sorrisos, gargalhadas, aprendizados, choros e perrengues. Vocês estarão sempre no meu coração.

Aos meus amigos da vida, Leticia e Diogo, estar com vocês é sempre um alívio e um escape da realidade, obrigada por todo incentivo e ajuda.

Aos professores do IFRJ, campus Maracanã, que foram sempre incríveis e me mostraram o que é ter amor por dar aula e pela profissão.

Ao IFRJ, que me proporcionou todas as experiências vividas.

Preciso também agradecer a todas as mulheres que vieram antes de mim e abriram caminho para que eu pudesse estar onde estou hoje.

A todos, o meu muito obrigada.

Ele não.

Resumo

A indústria cervejeira gera cerca de 45 milhões de toneladas de resíduos cervejeiros sólidos anualmente. O aproveitamento desses resíduos é necessário para que não ocorra um grande impacto ambiental, uma vez que sua rica composição em matéria orgânica dificulta sua disposição final. O bagaço de malte é o resíduo gerado em maior quantidade e seu principal destino é a formulação para ração animal. Entretanto, novos usos biotecnológicos desses resíduos vêm ganhando espaço no meio científico, servindo como base para obtenção de diferentes bioprodutos de interesse. A utilização do bagaço de malte é vantajosa pois é um material com baixo valor agregado, além de ter um alto valor nutricional e ser um material com grande resistência. O presente trabalho teve como objetivo a utilização do bagaço de malte como suporte para imobilização celular de bactérias lácticas para obtenção de ácido láctico por fermentação, um bioproduto de importância no mercado mundial. Foi avaliada a imobilização destas células em bagaço de malte pré-tratado (com NaOH) e não tratado. Posteriormente, foi avaliada a fermentação láctica em meio sintético com células imobilizadas e células livres, para comparação. Os resultados de imobilização obtidos indicaram necessidade de melhor exploração das condições de pré-tratamento do bagaço para imobilização, com potencial de melhor imobilização. Já os resultados da fermentação láctica indicaram maiores índices de acidez (expressa em ácido láctico) para o cultivo com células imobilizadas evidenciando vantagens no uso da técnica de imobilização.

Palavras-chaves: Imobilização celular, Bagaço de Malte, Fermentação láctica, Aproveitamento de resíduos

Abstract

The brewery industry generates about 45 million tonnes of solid brewery wastes annually. The use of such waste is necessary so there won't be a big environmental impact, once your rich composition in organic matter makes it difficult for your disposal. The brewer's spent grain is the residue generated in greater quantity and its main destination is the formulation for animal feed. However, new biotechnological use of these wastes have been gaining space in the scientific world, serving as a basis for obtaining of various bio-products of interest. The use of brewer's spent grain is advantageous since it is a material with low added value, and also having a high nutritional value and being a material with great resistance. The present work had as objective the use of brewer's spent grain as support for *Lactobacillus acidophilus* immobilization for lactic acid production by fermentation, a bioproduct of importance in the world market. The immobilization of these cells in pretreated (with NaOH) and untreated malt was evaluated. The immobilization results indicated a need for better exploitation of the pre-treatment conditions of the bagasse for immobilization, with potential for better immobilization. The results of the lactic fermentation indicated higher acidity indexes (expressed in lactic acid) for the culture with immobilized cells evidencing advantages in the use of immobilization technique.

Keywords: Cell immobilization, brewery waste, lactic fermentation, waste reuse

SUMÁRIO

1. JUSTIFICATIVA.....	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	03
2.1. Produção Cervejeira.....	03
2.2. Processo.....	03
2.3. Resíduos cervejeiros.....	05
2.3.1. Bagaço de malte.....	06
2.4. Imobilização celular.....	07
2.4.1. Imobilização na superfície do suporte.....	09
2.5. Bagaço de malte como suporte para imobilização.....	11
2.6. Ácido láctico.....	13
2.7. <i>Lactobacillus acidophilus</i>	15
3. OBJETIVO GERAL.....	17
3.1. Objetivos específicos.....	17
4. MATERIAS E MÉTODOS.....	18
4.1. Materiais.....	18
4.1.1. Bagaço.....	18
4.1.2. Bactérias lácticas.....	18
4.2. Metodologia.....	19
4.2.1. Propagação do cultivo microbiano.....	19
4.2.2. Imobilização das bactérias lácticas em bagaço de malte.....	20
4.2.2.1. Preparo do bagaço.....	20
4.2.2.2. Obtenção da biomassa para imobilização.....	21
4.2.2.3. Imobilização celular.....	22
4.2.3. Fermentação láctica.....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	25
5.1. Imobilização da bactéria láctica no bagaço de malte.....	25
5.2. Fermentação láctica.....	27
5.2.1. Aderência de células no bagaço de malte.....	27
5.2.2. Fermentação.....	28
5.2.2.1. Análise de pH.....	28
5.2.2.2. Acidez titulável expressa em ácido láctico.....	29
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	32
7. REFERÊNCIAS.....	33

1. Justificativa

A Cerveja é a bebida resultante da fermentação alcoólica de mosto de cereal maltado, geralmente malte de cevada, e que possui baixo teor alcóolico. Há evidências de que cerveja feita de cevada maltada já era fabricada na Mesopotâmia, onde a cevada cresce em estado selvagem, em 6000 a.C. Hoje, é a bebida alcoólica mais consumida em todo o mundo.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2014), o consumo médio de álcool no Brasil é de 8,7 L *per capita* por população acima de 15 anos, sendo cerveja a bebida mais consumida, representando cerca de 60% de todo consumo de álcool. No mundo, a média de consumo de álcool é de 8,4 L *per capita* por população com idade acima de 15 anos (OECD, 2019), e o consumo de cerveja é 34,8% (OMS, 2014). Em 2017, quase 200 bilhões de litros de cerveja foram produzidos no mundo, sendo o Brasil o 3º maior produtor, gerando cerca de 14 bilhões de litros da bebida (Barth-bericht, 2018).

Como qualquer indústria, a indústria cervejeira tem seus impactos ambientais, e, por isso, adota diversas medidas de sustentabilidade, como economia e reuso de água, reciclagem de insumos, e preservação de bacias hidrográficas. Entretanto, há resíduos do processo, como o bagaço de malte, o *trub* quente e a levedura residual cervejeira, que não podem deixar de ser gerados, por estarem intrinsecamente ligados ao processamento do cereal para produção do mosto, bem como para sua fermentação.

Em média, a cada cem litros de cerveja, 20 kg de bagaço de malte são gerados, representando 85% do total de resíduos sólidos deste processo de produção (Aliyu e Bala, 2011). Estima-se que a produção mundial anual deste resíduo cervejeiro seja de aproximadamente 39 milhões de toneladas, sendo a produção brasileira em torno de 3 milhões de toneladas/ano (Barth-Bericht, 2018). Este resíduo, representado pela casca do malte e demais frações não solubilizadas e, portanto, não extraídas para o mosto, é constituído, em média, de 30% de proteínas e 65% de fibras, e é visto como um subproduto industrial com baixo valor agregado (Aliyu e Bala, 2011). Ainda que boa parte possa ser utilizada para a produção de compostos destinados à alimentação animal (Vasconcellos; Carciofi, 2009) ou adubação em campos, muitas cervejarias não o aproveitam.

Diante deste cenário, diversos projetos visando agregar valor ao bagaço do malte vêm sendo desenvolvidos, seja utilizando o bagaço do malte de cevada na elaboração de

pão nutritivo, na produção de ração, na compostagem, ou até mesmo na produção de tijolos (Mussato, 2004). Para além disso, o bagaço de malte vem ganhando uma grande relevância na área de bioprocessos, na qual ele é utilizado na produção de bioenergia, biocombustíveis, como etanol, ou utilizado como substrato para produção de enzimas, como a lacase, e como suporte para imobilização celular e aplicação em diferentes processos fermentativos.

A imobilização celular é o método de capturar ou aderir as células microbianas, as células vegetais ou as enzimas em uma matriz adequada. Diferentes métodos, como encapsulamento, aprisionamento em gel e adsorção, são realizados para imobilizar as células. É uma tendência, pois a fermentação com células imobilizadas apresenta diversas vantagens conhecidas e estudadas há bastante tempo, como fácil reciclo de células, a possibilidade de uso de altas concentrações celulares no meio e a proteção que a matriz de imobilização pode trazer aos microrganismos (Trevan MD, 1988). Assim, a imobilização celular (ou enzimática) possui uma ampla aplicação na área de tratamento de água, produção biodiesel, imobilização de material biológico para pesquisa, extração de metabólitos, entre muitas outras (M.Elakkiya 2016).

Existem inúmeros suportes nos quais as células podem ser imobilizadas; esses suportes podem ser orgânicos ou inorgânicos, e a escolha do material adequado para o tipo de imobilização deve ser baseado no processo de imobilização e no resultado final desejado. O bagaço de malte pode ser um excelente suporte para imobilização celular, pois é um material resistente, com baixo custo, gerado intrinsecamente a um processo em grandes quantidades, e é um material poroso, o que facilita a adsorção das células.

Dentre os bioprodutos de interesse, pode se destacar o ácido láctico, que possui diversas aplicações na indústria química e de alimentos. Este produto pode ser obtido por via química, cuja produção é custosa e com condições operacionais adversas, ou por fermentação, pela atividade de bactérias lácticas. Desta maneira, a imobilização de bactérias lácticas em bagaço de malte pode ser uma alternativa, tanto para a produção de ácido láctico via fermentação quanto para o aproveitamento de um resíduo industrial.

Este trabalho de conclusão de curso foi desenvolvido no Laboratório de Fermentação do IFRJ, *campus* Rio de Janeiro, no qual se trabalha com processos básicos de fermentação que abrangem as áreas das indústrias química, de alimentos e de meio

ambiente, pesquisando, analisando e desenvolvendo novos métodos e técnicas essenciais para produção biotecnológica e aproveitamento de resíduos.

2. Revisão bibliográfica

2.1. Produção cervejeira

Cerveja é definida basicamente como uma bebida com baixo teor alcóolico preparada a partir do malte, lúpulo, fermento (levedura cervejeira) e água, podendo ainda ter outras matérias primas em sua composição, como milho, arroz e trigo (Siqueira, 2007).

A produção de cerveja pode variar em diferentes formas e cada país tem sua legislação específica. No Brasil, o Decreto nº 2314, de 04 de setembro de 1997, art.64 a art.71 define: “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” (Brasil, 1997). Ainda segundo a mesma legislação, parte do malte de cevada pode ser substituído por outros cereais, maltados ou não, como arroz, milho, trigo, aveia, centeio ou sorgo. No entanto, para o produto ser denominado cerveja, é necessário que a bebida possua proporção de malte de cevada maior ou igual a 50%, em peso, sobre o extrato primitivo, como fonte de açúcares (Brasil, 1997). O uso de adjuntos é comum em todo o mundo.

De forma geral, a cerveja pode ser dividida em dois grandes grupos. As do tipo *Ale* são as cervejas produzidas por meio de alta fermentação, normalmente mais encorpadas e possuem um sabor mais pronunciado de lúpulo, além de um teor alcóolico mais elevado, chegando até 8%. O segundo grupo, as cervejas do tipo *Lager*, são as cervejas produzidas pela chamada baixa fermentação, são as mais consumidas mundialmente e possuem uma tonalidade mais clara e um sabor mais suave, além de possuir um teor alcóolico mais baixo que as do tipo *Ale*, variando entre 4% e 5%. (Siqueira, 2007).

Do ponto de vista nutricional, a cerveja contém quantidades significativas de selênio e vitaminas do complexo B, principalmente B2 e B9. Além de possuir compostos antioxidantes, que são comparáveis aos do vinho branco (Lugasi, 2003; Siqueira, 2007).

2.2. Processo

O processo cervejeiro, pode ser dividido em algumas etapas: obtenção do malte de cevada; moagem dos grãos; mosturação, clarificação e cocção (etapas de preparo do

mosto cervejeiro); fermentação; e maturação (Tschope, 2001; Barbosa et al, 2017). Uma infinidade de variações pode ser explorada, de forma a serem obtidos os diferentes estilos de cerveja.

Inicialmente, no processo cervejeiro, o grão de cevada precisa ser malteado; este é o processo de germinação controlada de cereais. O objetivo principal é a formação de enzimas necessárias à hidrólise dos polissacarídeos (como amido) e outras macromoléculas (Siqueira, 2007; Barbosa et al, 2017). Após obtenção do malte seco, este pode ser adequadamente armazenado até o momento de uso.

Em seguida, o malte é submetido à moagem, que expõe suas frações e facilita o contato e a dissolução de seus constituintes em água, tornando o conteúdo do grão acessível à ação enzimática (Siqueira, 2007). O material moído é então transportado para o tanque onde ocorre a mosturação, que tem como objetivo promover a hidrólise do amido em açúcares fermentescíveis, que fornecem à levedura os elementos necessários para a produção de gás carbônico e álcool etílico. Ademais, também há atuação de outras enzimas, como β -glucanases e proteases, por exemplo.

Depois de atingido o nível de hidrólise desejado, o material sólido remanescente deve ser removido e o mosto clarificado (filtrado). Por decantação simples e formação de uma torta de filtração, o mosto é recirculado até à limpidez desejada e retirado. Nessa etapa, o primeiro resíduo cervejeiro é produzido, o bagaço do malte (Trommer, 2013).

Após a mosturação e clarificação, acontece a etapa de cocção, na qual o mosto recém obtido é aquecido à temperatura de fervura (cerca de 100°C) por tempo adequado, que varia, geralmente, entre 30 e 120 min. Ainda nesta etapa é feita a adição do lúpulo. Neste momento ocorre a inativação das enzimas e a desinfecção do mosto, reduzindo a carga microbiana remanescente. O segundo resíduo do processo é gerado, o *trub* quente, que é resultado da coagulação de proteínas e polissacarídeos de elevada massa molar, além de minerais (Trommer, 2013).

Obtido o mosto límpido após remoção do *trub* quente, o líquido segue para rápido resfriamento e para inoculação do agente de fermentação de interesse, normalmente leveduras do gênero *Sacharomyces*. Os dois tipos de cerveja mais importantes, *lager* e *ale*, são fermentadas com cepas de *S. uvarum (carlsbergensis)* e *S. cerevisiae*, respectivamente. Ocorrem transformações relacionadas ao metabolismo microbiano, com formação de etanol, CO₂, diversos subprodutos e biomassa celular. Encerrada a atividade intensa dos microrganismos, as células tendem a se depositar ao fundo do reator. A

biomassa celular pode ser reutilizada para novas fermentações, entretanto, em algum momento deverá ser descartada, formando o terceiro resíduo do processo, a levedura residual cervejeira (Trommer, 2013).

Após a fermentação, a temperatura do tanque é reduzida e a bebida entra no processo de maturação, que pode durar de uma semana até dois anos, dependendo da cerveja a ser produzida (Siqueira, 2007; Barbosa et al, 2017). Ocorrem alterações bioquímicas e sensoriais importantes para a qualidade do produto, além de iniciar a clarificação e a carbonatação natural da cerveja. Posteriormente, a bebida segue para envase e tratamento térmico de pasteurização, quando necessário (Siqueira, 2007; Barbosa et al, 2017).

2.2.1. Resíduos cervejeiros

A indústria cervejeira mundial produziu 1.951.748.000 hL de cerveja em 2017 (Barth-Haas, 2017). Aproximadamente 20kg de bagaço de malte, 1,5kg a 3kg de levedura residual e 0,2kg a 0,4kg de *trub* quente são produzidos a cada 100 L de cerveja (Mussato et al, 2006; Mathias, 2015). Sendo assim, a produção aproximada de bagaço de malte em 2017 foi de 39.034.960 toneladas no mundo. O esperado é que o mercado cervejeiro cresça cerca de 3,7% anualmente (Statista, 2019). Devido a esse cenário, as indústrias cervejeiras, principalmente as artesanais, em parceria com Instituições de ensino e pesquisa, começaram a criar projetos para reciclagem de resíduos, estudando formas de aproveitamento de resíduos (Mussato et al., 2007; Mathias et al., 2017).

O *trub* quente, que é proveniente da coagulação de proteínas, varia a composição de acordo com o tipo de cevada, processo de secagem do malte, local de cultivo, pH do meio, entre outros. Mas, de maneira geral, ele é composto de proteínas (50-70%); substâncias amargas do lúpulo que não foram solubilizadas (10-20%); polifenóis (5-10%); carboidratos (4-8%), dos quais pectinas, glucanas e amido; minerais (3-5%); e ácidos graxos (1-2%).

A levedura residual, proveniente da fermentação do mosto cervejeiro, tem uma composição predominantemente proteica, porém pode variar de acordo com os parâmetros de fermentação, e principalmente de acordo com a espécie do microrganismo utilizado na fermentação (*S. cerevisiae* ou *S. uvarum*).

Tanto o *trub* quente quanto a levedura residual, podem ser usados para enriquecer o bagaço de malte e servir como fonte de alimentação animal, além de diversas outras aplicações biotecnológicas. O bagaço de malte, objeto deste estudo, será abordado a seguir.

2.2.1.1. Bagaço de malte

Aproximadamente 20kg de bagaço de malte (BM) são gerados a cada 100 litros de cerveja produzida. Esse é o primeiro resíduo sólido gerado no processo cervejeiro. Sua composição pode variar de acordo com o tipo de cevada e de acordo com a condução da etapa de mostura e clarificação, no preparo do mosto cervejeiro (Mathias, 2015; Aliyu e Bala, 2010). De modo geral, o bagaço de malte seco tem a composição de 14,2% a 26,7% de proteínas, 3,9% a 13,3% de lipídeos, 12% a 25,5% de celulose, 21,8% a 40,2% de hemicelulose e 4% a 27,8% de lignina (O'Brien et al., 2012; Malen et al., 2018), além de monossacarídeos como xylose, glicose e arabinose, minerais e aminoácidos (Aliyu e Bala, 2011).

Por ter uma composição com alto teor de fibras e proteínas, o bagaço de malte pode ser utilizado para alimentação animal, principalmente para ruminantes bovinos, mas também para peixes (Jayant et al., 2018). O bagaço pode ser combinado com outros aminoácidos para que o seu valor nutricional possa contemplar toda as necessidades nutricionais do animal. Quando enriquecido, também promove um aumento na produção de leite dos animais bovinos sem afetar sua fertilidade (Mussato et al., 2006; Malen et al., 2018).

Além da alimentação animal, este material também pode ser consumido por humanos, na forma de pães e bolos. O bagaço de malte passa por um processo de maceração até que se forme uma farinha que pode ser usada no preparo de vários alimentos (Mussato et al., 2006).

Outros usos possíveis para este resíduo são: produção de energia, seja por combustão direta ou por fermentação anaeróbica para a produção de biogás; produção de carvão vegetal; produção de componentes de tijolo, usado para aumentar a porosidade do material; fabricação de papel e outros (Mussato et al., 2006).

O bagaço também tem grande utilização em processos biotecnológicos, como substrato para produção de enzimas e para produção de microrganismos. Além de sua capacidade de adsorção, que pode ser usada para remover compostos orgânicos voláteis de gases residuais (Mussato, 2006).

Devido à sua estrutura complexa, o bagaço de malte ainda tem a possibilidade de ser usado como suporte de imobilização, seja celular ou enzimática, e aplicado em bioprocessos industriais. Esse resíduo pode ser usado como suporte de imobilização de leveduras, como as do gênero *Saccharomyces*, na produção contínua cervejeira, por exemplo, ou na produção de lacase com enzimas imobilizadas (da Silva, et al., 2012).

2.3. Imobilização celular

A imobilização celular pode ser denominada como uma técnica que confina as células em um espaço físico definido, sendo mantida sua completa atividade (Mendes, 2009). Essa técnica é restringida à produção de metabólitos extracelulares ou à utilização de microrganismos como biocatalisadores (Covizzi et al., 2007). Os processos de imobilização são utilizados principalmente para produções contínuas, como em produções cervejeiras, por exemplo (Brányik 2005).

A imobilização permite um aumento da produtividade de processos fermentativos, em comparação ao uso de células livres, devido à alta concentração de células presentes em um suporte de imobilização (Covizzi et al., 2007). Além disso, facilita o reuso de células e diminuem etapas de separação/recuperação do produto. São indicados, ainda, para processos fermentativos realizados em condições adversas de pH, estabilidade e agitação, nos quais a utilização de células livres seria dificultada, pois assim as células ficariam mais expostas (Verbelen et al 2006).

A imobilização pode ser realizada por quatro diferentes técnicas: imobilização em suporte sólido; aprisionamento em matriz porosa; floculação; e barreira de contenção mecânica (Karagoz, 2019). A escolha do método de imobilização deve ser baseada em parâmetros como custo do procedimento de imobilização, toxicidade dos reagentes de imobilização, contaminação, mudanças no produto final produzido, entre outros (Branyik et al., 2001; Mendes, 2009). A Figura 1 apresenta os tipos de técnicas de imobilização.

O método de aprisionamento está baseado na inclusão artificial das células, que ficam inseridas em uma malha rígida, ou semirrígida, que aprisiona a célula e impede sua difusão para o meio. A vantagem do método é ter um maior controle sobre a quantidade celular em cada matriz utilizada. Já a floculação consiste na formação de agregados celulares em suspensão, associada a uma rápida sedimentação de maneira natural, ou na presença de agentes floculantes ou ligantes. Essa técnica é utilizada principalmente para imobilização de leveduras (Branyik et al., 2001; Mendes, 2009; Karagoz, 2019).

O princípio do método de imobilização entre membranas, ou encapsulação, é baseado no confinamento da célula entre duas membranas permeáveis. As barreiras mecânicas de contenção podem ser membranas filtrantes ou microcápsulas. A diferença entre este método e o de aprisionamento é que, neste último, as células estão numa malha/matriz, enquanto que na encapsulação, as células ficam apenas envoltas por uma membrana, não havendo separação entre elas (Branyik et al., 2001; Mendes, 2009; Karagoz, 2019).

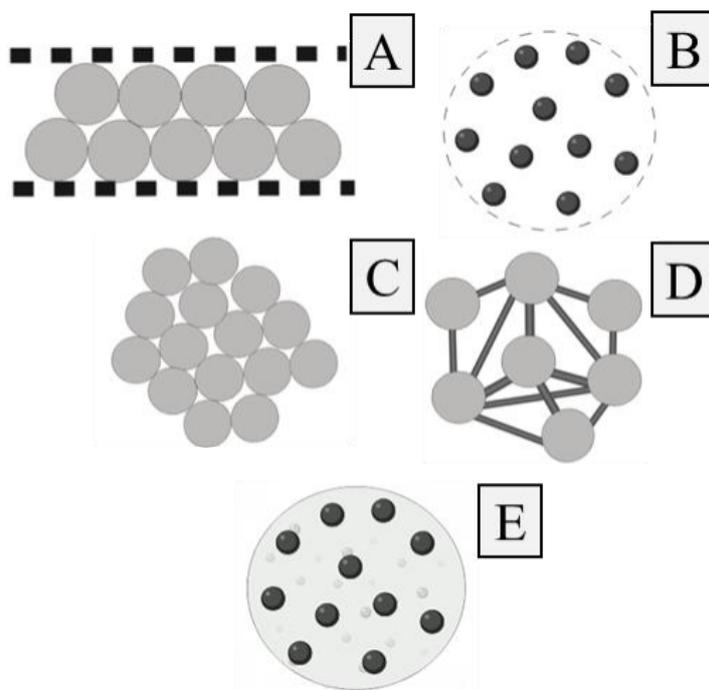


Figura 1 -Diferentes métodos de imobilização celular. (a) Contenção entre membranas; (b) Microencapsulação; (c) Floculação natural; (d) Floculação artificial (ligação cruzada); (e) Engaiolamento em matriz porosa, adaptado de Pilkington et al. (1998).

A imobilização por adsorção em suportes é o método mais prático de se obter células imobilizadas, e, por ser o objeto deste estudo, será abordado a seguir.

2.3.1. Imobilização na superfície do suporte

O método de imobilização na superfície de um suporte foi baseado na capacidade natural de fixação de microrganismos em diferentes tipos de superfície. A adsorção é um processo no qual as células, ou proteínas, estão ligadas à superfície do suporte orgânico ou inorgânico de maneira reversível (Karagoz, 2019). No caso específico de microrganismos, a técnica pode ser auxiliada pela capacidade de grupos microbianos produzirem biofilmes, que promovem sua adesão às superfícies. As vantagens do método são: simplicidade, baixo custo, fácil manipulação e grande diversidade de matérias possíveis de serem usadas como suporte (Branyik et al., 2001; Mendes, 2009; Karagoz, 2019).

Os suportes podem ser classificados entre orgânicos e inorgânicos, ou também podem ser classificados de acordo com a sua porosidade ou estrutura em gel. A escolha de um suporte se dá mediante às suas características, como: permeabilidade, morfologia, área superficial, resistência, custo, disponibilidade e outros (Mendes 2009).

Os suportes não porosos diminuem a área superficial disponível para adsorção e não promovem proteção às células microbianas. Já os suportes porosos, os mais utilizados neste tipo de técnica, apresentam uma área interna que possibilita proteção contra a turbulência externa do meio, que pode ser favorável em alguns casos de imobilização, como a imobilização enzimática. Entretanto, não há o controle exato da quantidade de células imobilizadas no material (Branyik et al., 2001; Mendes, 2009; Karagoz, 2019).

A técnica de imobilização por adsorção apresenta algumas desvantagens, como concentração celular mais baixa do que as obtidas em sistemas nos quais as células são aprisionadas. Além disso, como não há barreiras entre as células e o meio de fermentação, o descolamento e a realocação celular são possíveis. Por esse motivo, a imobilização celular é limitada para alguns tipos de microrganismos (Verbelen, 2006). Entretanto, devido à facilidade operacional e à grande disponibilidade de materiais para serem usados como suporte, esta técnica tem grandes aplicações em processos fermentativos e enzimáticos.

A Figura 2.a demonstra a imobilização por adsorção, quando a célula adere ao suporte naturalmente; a Figura 2.b ilustra a imobilização por componentes iônicos, quando há interações eletrostáticas entre os ligantes; e, por fim, a Figura 2.c esquematiza

a imobilização por ligação covalente, que se utiliza de algum agente ligante entra a matriz e a célula (Verbelen, 2006; Mendes, 2009; Karagoz, 2019)

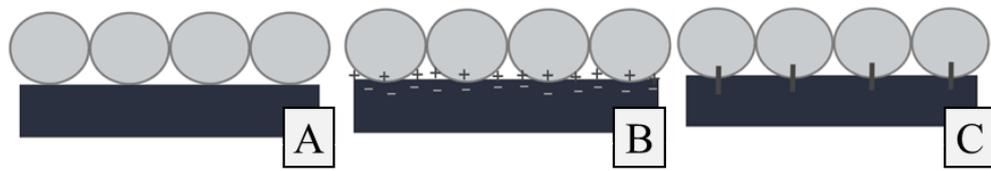


Figura 2- (a) imobilização por adsorção; (b) imobilização por componentes iônicos; (c) imobilização por ligação covalente adaptado de Pilkington et al. (1998).

A imobilização por adsorção é amplamente utilizada e a principal forma escolhida para produção de bebidas e combustíveis. Por exemplo, a produção contínua cervejeira tem utilizado alguns tipos de suportes que são, normalmente, resíduos de alguma outra produção, alguns exemplos são: lascas de madeira, terra diatomácea, dietilaminoetil celulose, resíduos de glúten provenientes do milho e bagaço de malte (Brányik 2005). O quadro 1 resume dados da literatura com exemplos de suportes e dos diferentes tipos de processos que podem ser realizados a partir de um método de imobilização celular.

Processo	Imobilização	Suporte utilizado	Referência
Produção de pigmento	<i>Planococcus</i> sp.	Resíduos da indústria de papel Paper mill sludge	Majumdar et al., 2019
Produção de biodiesel	Lipases	Carbônio ativado	Lee et al., 2019
Produção de hidrogênio	<i>Enterobacter aerogenes</i>	multi-walled carbon nanotube (MWCNT-COOH) Fibras de carbono	Boshagh, 2018
Ácido láctico	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Casco de sementes de girassol Bagaço de malte Beterraba	Mladenović et al., 2018
Produção de vinho	<i>Kluyveromyces</i> <i>Candida</i> <i>Saccharomyces</i> <i>Pichia</i>	material celulósico deslignificado cascas de uva restos de maçã	Nikolau et al., 2018
Produção de ácido caproico	<i>Clostridium kluyveri</i>	Palha de trigo	Zhang et al., 2019
Produção de xilooligossacarídeos	<i>Bacillus subtilis</i>	Bagaço de milho	Wu et al., 2019
Produção de biocatalisadores	<i>Candida antarctica</i>	quitosana	Pinheiro et al., 2019
Produção contínua cervejeira	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	Bagaço de malte	Brányik, 2004

Quadro 1 – Suportes utilizados em técnicas de imobilização celular, para produção de diversos produtos;

2.4. Bagaço de malte como suporte de imobilização

A escolha do melhor suporte para imobilização depende das propriedades do material de suporte (preço, estabilidade, rigidez, ser inerte à reação, regeneração, aprovação para uso alimentar) e dos mecanismos de imobilização (tipo, facilidade, carga celular, modificações do metabolismo microbiano). Por esse motivo, os suportes à base de celulose têm sido mais utilizados do que os suportes inorgânicos, pois eles são reutilizáveis, esterilizáveis pelo calor, biologicamente e quimicamente estáveis sob

condições de fermentação, podem ser utilizados para fins alimentícios, não alteram o sabor do produto em que ele está sendo utilizado, entre outros (Brayinc, 2005).

O uso do bagaço de malte como suporte para imobilização celular é uma vantagem pois é um material de fácil acesso, numeroso no mundo, pois, é um resíduo intrínseco da indústria cervejeira e tem uma aplicabilidade reduzida, servindo principalmente para alimentação animal. Para além disso, o bagaço é um material poroso e com superfície hidrofóbica, o que faz as células se aderirem com mais facilidade e facilita a retenção mesmas (Brayinc, 2005).

Na literatura, o uso do bagaço de malte como suporte para imobilização é vasto, podendo ser usado para produção contínua cervejeira (Branýic, 2006; verbelen, 2006), para produção de etanol (Kopsahelis et al.,2007), produção de lacase (da Silva et al., 2012), biossorção de chumbo (Kordialik-Bogacka, 2014), produção contínua de vinho (Athanasios et al., 2007), entre outros.

Para que o bagaço de malte seja utilizado como suporte de imobilização, pode ser necessário um pré-tratamento deste resíduo, dependendo do processo em que o mesmo será utilizado. O objetivo do pré-tratamento na imobilização celular é melhorar o processo de adsorção entre a célula e o suporte.

Esse pré-tratamento pode ser de origem química (agentes oxidativos, ácido diluído, amônia ou líquidos iônicos) mecânica (sonicação, extrusão ou moagem) ou físico-química (hidrotérmico, explosão a vapor ou micro-ondas). Portanto, o pré-tratamento tem influência direta no arranjo dos componentes da estrutura do material lignocelulósico. A eficiência do pré-tratamento é influenciada por variáveis como: relação sólido: líquido, temperatura, pressão e tamanho da partícula da biomassa.

2.5. Ácido Láctico

O ácido láctico é um ácido orgânico (Figura 3) de três carbonos: um átomo de carbono terminal que faz parte de um grupo ácido ou carboxílico; outro átomo de carbono terminal que faz parte de um grupo metilo ou hidrocarboneto; e um átomo de carbono central ligado ao grupo álcool.

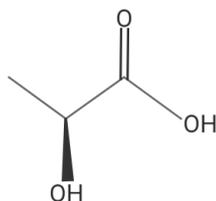


Figura 3 – molécula de ácido láctico

O ácido láctico pode ser produzido a partir de duas vias, pela via fermentativa ou por sua síntese química. Com produção pela síntese química, é possível obter uma mistura racêmica do ácido D (+) e D (-) láctico, porém de forma mais custosa e menos acessível. Pela síntese fermentativa, o ácido láctico produzido pode ser feito de forma menos custosa e mais acessível, além de ser possível a utilização de substratos renováveis (Mussato, 2007).

Devido às suas inúmeras aplicações, a produção de ácido láctico tem um mercado global superior a 100.000 toneladas por ano, e previsão de uma taxa de crescimento anual de 15% do mercado devido à possibilidade de fabricar plásticos biodegradáveis (Idris e Suzana 2006). Com esse aumento da demanda, surge um interesse maior em encontrar métodos alternativos para produzir ácido láctico ao menor custo possível (Mussato 2007). O ácido láctico pode ser utilizado como agente acidulante e conservante, com inibição da contaminação por *Salmonella*, por exemplo (Li et al., 2019), como inibidor do ressecamento de células da pele humana (Hasan et al., 2019), para fermentação de sementes de legumes, visando inibir o desenvolvimento de contaminantes (Budryn et al., 2019), entre outros.

No quadro 2 é apresentada uma relação demonstrando os diferentes tipos de substratos e microrganismos que podem ser utilizados para produção de ácido láctico.

Fonte de substrato	Microrganismo	tf (h)	Produtividade (g/L.h)	Referência
Cana de açúcar	<i>Bacillus coagulans</i>	25	3,4	Oliveira et al (2019)
Glicose	<i>Rhizopus oryzae</i>	96	1,05	Pimtong et al (2017)
Extrato de levedura		215	0,72	
MRS	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp.	300	1,5	Faschian et al. (2015)
Glicose	<i>Rhizopus oryzae</i>	60	3,7	Luo et al. (2016)
Xylose	<i>Enterococcus mundtii</i>	108	3,4	Abdel - Rahman et al. (2016)
Recycled paper sludge	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	72	0,4 - 6,9	Marques et al. (2017)
Resíduos agrícolas	<i>Enterococcus faecalis</i>	180	6,37	Reddy et al. (2016)
Resíduos agrícolas	<i>Lactobacillus Rhamnosus</i>	150	1,45	Wang et al. (2016)
Suco de Sorgo			17,55	
Resíduos cervejeiros	<i>L. delbruecki</i> subsp. <i>delbruecki</i>	18	0,14	Mathias (2015)

Quadro 2 Exemplos de fonte de substratos para produção de ácido láctico pela fermentação de diferentes microrganismos e sua produtividade.

2.6. *Lactobacillus acidophilus*

A produção de ácido láctico por fermentação se dá, classicamente, pela atividade das bactérias do ácido láctico (ou simplesmente bactérias lácticas), grupo microbiano no que tem o gênero *Lactobacillus* como maior agente de fermentação, com mais de 50 espécies no total. Eles são comumente encontrados nas regiões orais, vaginais e intestinais de muitos animais. São importantes microrganismos que podem ser usados na indústria alimentícia para produção de queijos, iogurtes e leites fermentados, todos produtos derivados de fermentação láctica, que inibe o crescimento de outros organismos e diminui o pH do alimento. Ainda, são utilizados nas indústrias farmacêutica e têxtil (Mussato 2007; Gangiredla et al., 2018).

O gênero *Lactobacillus* foi proposto pela primeira vez há mais de 100 anos em 1901 por M. W. Beijerinck. A espécie *acidophilus* foi assim chamada talvez porque, historicamente, os lactobacilos são isolados do trato intestinal e da vagina de humanos e animais, onde o ambiente pode ser bastante ácido. *Lactobacillus acidophilus* é uma das espécies mais comumente reconhecidas do gênero *Lactobacillus*. Isto é principalmente devido à comercialização desta espécie em vários alimentos fermentados e suplementos dietéticos que promovem a saúde (Ismail et al., 2018).

Morfologicamente, o grupo apresenta a forma de bastonetes Gram-positivos, não formadores de esporos, com extremidades arredondadas, geralmente 0,6-0,9 1,5-6 µm, que ocorrem isoladamente, em pares e em cadeias curtas (Ismail et al., 2018).

O grupo é composto principalmente por lactobacilos homofermentativos, mas alguns são heterofermentadores facultativos. Inicialmente, o grupo foi classificado como termobactéria láctica por causa de sua capacidade de crescer a 45 °C e seu metabolismo homofermentativo. (Ozogul e Hamed, 2016).

Os microrganismos desta espécie são exigentes nutricionalmente e não requerem apenas carboidratos (utilizados como fonte de carbono), mas também nucleotídeos, aminoácidos e vitaminas. Pentotenato de cálcio, ácido fólico, niacina e riboflavina, por exemplo, são essenciais à atividade microbiana. Podem, entretanto, se adaptar ao crescimento em substratos orgânicos complexos (Ozogul e Hamed, 2016).

Uma boa atividade de *Lactobacillus acidophilus* ocorre entre 37°C a 45° C, em meios levemente ácidos, com um pH inicial de 6,4 a 4,5. Embora a maioria das cepas seja razoavelmente aerotolerante, o crescimento ótimo é obtido sob condições microaerofílicas ou anaeróbicas (Ozogul e Hamed, 2016).

3. Objetivo

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a imobilização de bactérias lácticas (*Lactobacillus acidophilus*) em bagaço de malte residual de cervejaria para produção de ácido láctico por fermentação.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o pré-tratamento do bagaço de malte para imobilização;
- Avaliar a imobilização com e sem pré-tratamento do bagaço de malte;
- Avaliar a produção de ácido láctico em meio sintético utilizando-se de células livres ou imobilizadas em bagaço de malte.

4. Materiais e métodos

4.1. Materiais

4.1.1. Bagaço de malte

O bagaço de malte utilizado no trabalho foi doado pela cervejaria Noi (Itaipu, Niterói - RJ). O bagaço foi doado uma única vez, em quantidade suficiente para que todo trabalho fosse realizado.

Inicialmente, foi feita uma etapa de secagem, para que o material pudesse ser armazenado sem o risco de contaminação. O bagaço foi disposto em bandejas e seco em estufa de circulação de ar (FANEM, ORION 515) a 65°C por 24 horas. O bagaço seco foi armazenado em caixas de plástico de 14L e mantido a temperatura ambiente. Para ser utilizado como um suporte para imobilização, o bagaço seco foi triturado em liquidificador para o aumento de sua área superficial (Figura 4).



Figura 4 - bagaço de malte triturado

4.1.2. Bactérias lácticas

A bactéria utilizada para a imobilização, *Lactobacillus acidophilus*, foi adquirida comercialmente através dos medicamentos Florastor® e Leiba®. Ambos os medicamentos são disponibilizados em cápsulas, onde cada cápsula contém aproximadamente $2,0 \times 10^8$ UFC de *Lactobacillus acidophilus* liofilizados. Esta forma de apresentação foi adotada devido à alta concentração de microrganismos disponível nas cápsulas e à facilidade de acesso, além da redução do número de etapas de laboratório.

Para avaliar o conteúdo das cápsulas, foi realizado o teste de coloração de Gram (Wistreich e Lechtman, 1980; Locquin e Langeron, 1983) e feita a observação dos microrganismos ao microscópio, conforme observado na Figura 5.

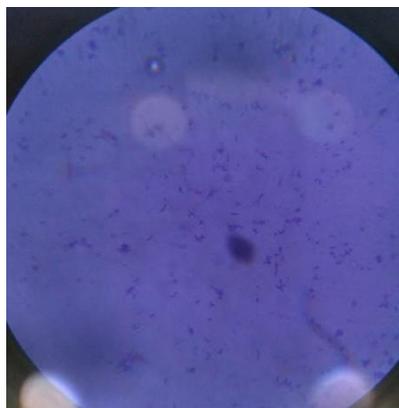


Figura 5 – Resultado do teste de coloração de Gram

4.2. Metodologia

4.2.1. Propagação do cultivo microbiano

O meio utilizado para ativação e propagação das culturas foi o caldo MRS (SIGMA-ALDRICH e Acumedia), meio amplamente utilizado para cultivo de *Lactobacillus* (Ozogul e Hamed, 2016). O meio foi preparado seguindo as indicações do fabricante e esterilizado a 0,5atm, 111°C, por 20 min. Dois meios de fabricantes diferentes foram usados, o meio da marca Acumedia foi usado para propagação das bactérias liofilizadas provenientes da Leiba®, na etapa de avaliação da imobilização celular, e o meio da marca SIGMA foi utilizado para propagação das bactérias liofilizadas provenientes da Florastor®, na etapa da avaliação da fermentação.

Para que a relação entre absorvância e massa seca fosse estabelecida, foi elaborada uma curva padrão de turbidimetria. Inicialmente, foi feita a ativação das bactérias liofilizadas pela abertura, de forma asséptica, de uma cápsula em um tubo de ensaio contendo 30 mL de meio MRS esterilizado (Figura 6.a). 10 mL do tubo de ensaio foram transferidos para um frasco Erlenmayer contendo 250 mL de meio MRS estéril (Figura 6.b), que foi incubado em estufa (Tecnal, TE-4200) a 37° por 24h (Figura 6.c). O procedimento se realizou em duplicata.

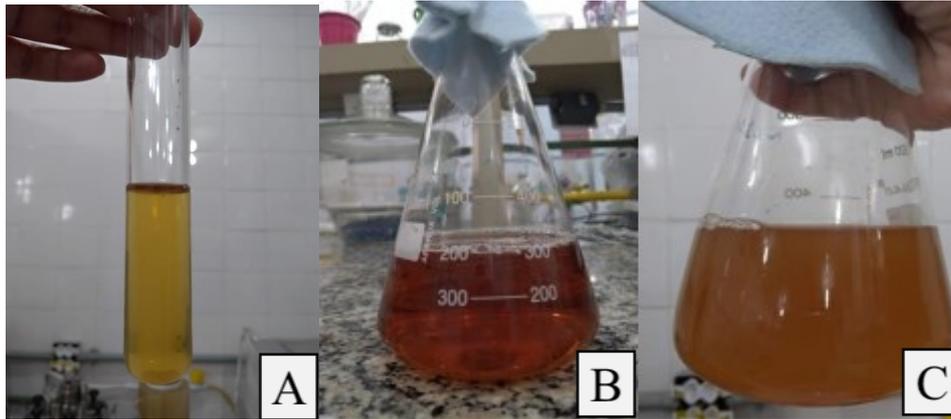


Figura 6- (a) caldo MRS esteril em tubo de ensaio (b) Caldo MRS esteril utilizado para propagação celular (c) caldo MRS turvo após crescimento celular

A quantificação das bactérias lácticas foi feita pela leitura da absorvância em espectrofotômetro (Biochrom, libra S12) a 480 nm de comprimento de onda, pico de absorção determinado para este micro-organismo (Mathias, 2015). Foi feita, ainda, a determinação da massa seca de células por secagem em estufa de ar seco (Quimis, 317.B 242) a 105°C, até massa constante (AOAC, 1975). Com os dados de absorvância e massa seca, foi construída a curva de correlação.

4.2.2. Imobilização das bactérias lácticas em bagaço de malte

4.2.2.1. Preparo do bagaço

Para análise da imobilização celular no bagaço de malte, dois experimentos foram realizados em concomitância, para comparação. Ambos os experimentos foram feitos em duplicatas. Em uma imobilização, o bagaço utilizado passou por um pré-tratamento (BMT), enquanto que na outra imobilização não foi realizado nenhum pré-tratamento no bagaço (BMN).

O pré-tratamento escolhido para o trabalho foi do tipo químico. O bagaço de malte triturado foi submergido em uma solução de hidróxido de sódio (NaOH) 2% v/v, com a proporção de 30g de sólido para 500 mL de líquido, por 24h a 30°C (Baryinc, 2004; Mussato, 2007; Kopsahelis, 2007). Após as 24h, o bagaço foi lavado com água destilada até pH neutro. O bagaço úmido foi colocado em estufa a 60°C até que ele ficasse completamente seco.

O bagaço de malte tratado (BMT) (Figura 7.a; 7.b) e o bagaço de malte não tratado (BMN) (Figura 7.c) foram separados em frascos Erlenmeyers, na quantidade de 1g de sólido, para esterilização em autoclave (0,5 atm/111°C/15 min.).

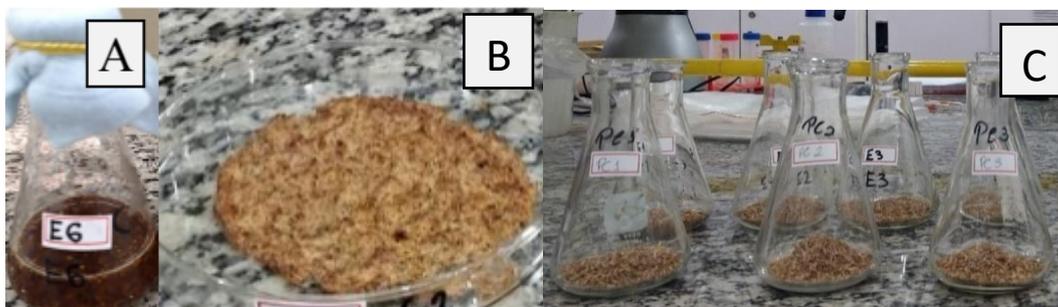


Figura 7- (a) bagaço de malte após pré tratamento (b) Bagaço de malte após pré-tratamento seco (c) bagaço de malte natural

4.2.2.2. Obtenção de biomassa para imobilização

Todas as etapas dos experimentos foram feitas de forma asséptica. O preparo do meio se deu de acordo com o item 4.2.1. A cápsula contendo as bactérias liofilizadas foi aberta em um tudo de ensaio com aproximadamente 30mL de caldo MRS, e cerca de 10 mL deste foram inoculados em um frasco Erlenmeyer contendo 250mL do mesmo meio. O sistema foi colocado em estufa a 37°C por 14h. Após as 14h de crescimento, a absorbância do meio crescido foi lida, para que houvesse a quantificação de bactérias.

Após crescimento, os meios foram divididos em tubos Falcon de 50mL, estéreis, e centrifugados a 2938g por 15 min para sedimentação celular. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em solução salina (NaCl) 0,9%. O conteúdo dos tubos foi vertido em uma proveta estéril e avolumado para 200mL. A suspensão mãe (solução salina + células) (Figura 8) assim obtida foi analisada por turbidimetria para quantificação celular.

Para avaliar as condições de imobilização, o estágio de crescimento celular não foi estabelecido como pré-requisito, apenas a quantidade de microrganismos foi o interesse desta etapa.



Figura 8- Suspensão mãe de bactérias lácticas

4.2.2.3. Imobilização celular

A suspensão mãe foi adicionada aos frascos Erlenmeyer contendo 1g de BMT ou BMN, na quantidade de 30 mL. O sistema contendo o bagaço mais a suspensão celular foram colocados em estufa com agitação para realizar a imobilização celular por adsorção (Figura 9). A imobilização foi feita por 24h a 37°C e com uma agitação de 70rpm. Após as 24h, a suspensão foi retirada e uma nova solução salina 0,9% foi colocada na mesma proporção (1g de sólidos:30mL de solução) para verificar o desprendimento celular. O experimento teve a duração de 12h a 37° e agitação de 70rpm.



Figura 9 - (a)Suspensão celular no bagaço (b) Erlenmeyers na estufa para imobilização celular

Para avaliar a quantidade de células imobilizadas, foi realizada a leitura pelo espectrofotômetro para análise da absorbância e determinada a massa seca da fração líquida recolhida após as 24h de imobilização e 12h de desprendimento celular. Com isto, foi possível calcular o percentual de células que ficaram aderidas no meio sólido.

Para análise da massa seca, as amostras foram filtradas em papel de filtro qualitativo, com gramatura de 80 g/m², com auxílio de bomba a vácuo, para que as partículas maiores do bagaço ficassem retidas. Após a primeira filtração, as amostras foram filtradas novamente em membrana gs em éster de celulose 0,22µm de poro e 25mm de diâmetro previamente secas e pesadas para determinação de sua massa inicial. As membranas contendo as células após filtração foram colocadas em estufa de calor seco a 105°C até massa constante.

4.2.3. Fermentação láctica

Para avaliar a capacidade de fermentação, apenas de forma preliminar, foram realizadas fermentações lácticas em meio sintético, sem otimização de parâmetros. O meio de fermentação foi produzido utilizando 12% de glicose, 1% de extrato de levedura em pó e 1% de peptona de carne, adaptado da literatura (Miller et al., 2017). O meio teve o pH ajustado para 6,5 e foi esterilizado a 0,5 atm (111°C) por 20min.

A fermentação foi realizada com o BMT e com células livres para controle (sem a presença de bagaço de malte). Ambos os experimentos foram realizados em duplicata e todos os passos foram feitos de forma asséptica. O processo de imobilização no BMT foi realizado da mesma forma descrita no item 4.2.2.2. Após as 24h de imobilização, a suspensão foi retirada e o meio para fermentação colocado na mesma proporção (1g:30mL). Já para fermentação com células livres, as células propagadas em caldo MRS foram inoculadas no meio na proporção de 10% do volume. A quantidade de células a ser inoculada foi determinada por massa seca.

A fermentação ocorreu por 24h, a 37°C, sob agitação de 70 rpm, e foi acompanhada pela amostragem nos pontos 0h, 3h, 6h, 8h e 24h, cujas amostras foram analisadas em função do pH (pHmetro de bancada) e da acidez titulável (com NaOH 0,01N), utilizando fenolfitalcina como indicador.

Os cálculos para acidez foram feitos pela correlação entre número de mols de NaOH na titulação, que foi possível ser conhecido através do volume e concentração utilizados, e massa molar do ácido láctico. Esta determinação indireta foi adotada devido à característica homofermentativa da bactéria láctica utilizada no trabalho.

A equação utilizada para os cálculos de acidez é descrita a seguir:

$$C_{AL} = \frac{V_{NaOH} \times C_{NaOH} \times fc \times MM_{AL}}{V_A}$$

Onde:

C_{AL} = concentração de ácido láctico em g/L;

V_{NaOH} = volume em mL de NaOH gasto na titulação;

C_{NaOH} = concentração do NaOH utilizado na titulação em mol/L;

fc = fator de correção do NaOH

MM_{AL} = massa molar do ácido láctico (90 g/mol);

V_A = volume da amostra em mL

5. Resultados e discussão

5.1. Imobilização da bactéria láctica no bagaço de malte

A imobilização celular no bagaço se deu em dois experimentos distintos, BMT, bagaço de malte pré-tratado e BMN, bagaço de malte natural. Ambos foram adicionados de uma suspensão mãe de bactérias lácticas com concentração inicial de 1,53 mg/mL, que foi definida pela relação entre massa seca e absorvância descrita no item anterior.

A análise dos resultados da concentração final de células foi feita por massa seca. Inicialmente os resultados seriam analisados por turbidimetria, porém ficou constatado que o bagaço altera a coloração do meio (Figura 10), tornando inviável a análise pelo espectrofotômetro.

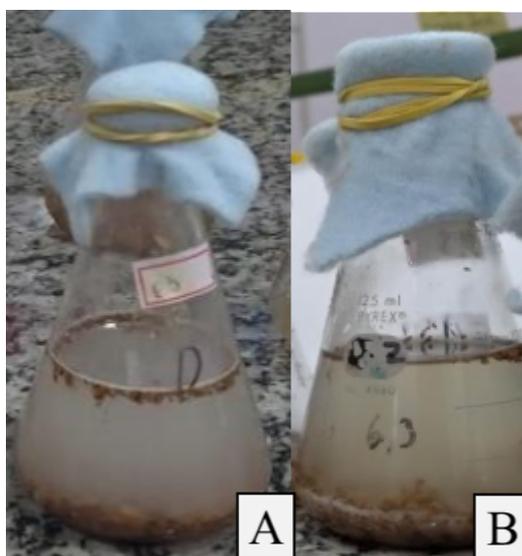


Figura 10 - Comparação na coloração do líquido (a) antes da imobilização celular e (b) depois

Entretanto, a análise por massa seca também se mostrou inviável, pois a reprodutibilidade dos resultados é incerta. A massa seca das bactérias não pode ser comprovada pois é possível que algumas micropartículas do bagaço tenham influenciado o resultado final.

O que seria sugerido para uma melhor análise dos resultados de imobilização é a utilização de técnicas de maior especificidade, como por exemplo, plaqueamento e contagem de colônias, ou a técnica do número mais provável.

A Tabela 1 apresenta os valores encontrados para imobilização celular. Como observado, a porcentagem de células aderidas ao bagaço na amostra BMN após as 24h foi de 50%, enquanto que no BMT, foi de 52%. Os valores são próximos, mas sugerem aumento da adesão celular na biomassa pré-tratada, indicando a necessidade de explorar diferentes condições de pré-tratamento para a avaliar a viabilidade técnica e econômica, além da necessidade de uma avaliação estatística para verificação da real diferença dos resultados.

Amostra	Células imobilizadas				
	Concentração inicial no meio líquido (mg/mL)	Concentração final no meio líquido (mg/mL)	≠	Porcentagem aderida	Porcentagem não aderida
BMN	1,53	0,77	0,76	50	50
BMT	1,53	0,74	0,79	52	48

Tabela 1- Resultado da imobilização celular, os valores foram obtidos por massa seca.

De acordo com da Silva e colaboradores (2012), a imobilização de enzimas no bagaço de malte natural, teve um resultado de até 40% de imobilização, não tão distante do obtido para o bagaço não tratado (BMN) do presente trabalho. Entretanto, ao realizar um tratamento com ácido e base, suas respostas foram mais satisfatórias, com 94% de imobilização.

Kopsahelis e colaboradores (2017) realizaram um estudo comparativo entre o uso do bagaço de malte tratado e o uso do bagaço natural na produção de álcool pela fermentação com *Saccharomyces cerevisiae* imobilizada. Segundo o trabalho, os resultados de imobilização foram mais favoráveis para o bagaço de malte tratado, obtendo uma concentração maior de células. Entretanto, esse trabalho ratifica que a utilização do suporte sem o pré-tratamento é possível e pode igualmente obter o produto desejado.

Outros trabalhos, como Dragone e colaboradores (2007) e Kordialik-Bogacka (2014), do mesmo modo, demonstraram que o bagaço de malte tratado obtém maior

capacidade de imobilização. Os trabalhos citados realizaram pré-tratamento diferente, do realizado no presente trabalho, utilizaram de um ácido forte, para desconstruir a fração hemicelulótica do bagaço de malte.

De modo geral, o bagaço de malte pré-tratado é um suporte com uma melhor resposta de imobilização, em grande parte, devido ao aumento de sua porosidade, aumentando a superfície do suporte, o que facilita a adsorção das células.

Os resultados do presente trabalho sugerem que o pré-tratamento realizado no bagaço foi ligeiramente favorável para imobilização celular, pois uma maior quantidade de células foi aderida. No entanto, os resultados do experimento de desprendimento celular, mostrado na Tabela 2, mostraram que o bagaço sem um pré-tratamento teve uma melhor adsorção, pois as células ficaram aderidas por uma maior quantidade de tempo.

Desprendimento celular					
Amostra	Concentração inicial no bagaço (mg/mL)	Concentração final no meio líquido (mg/mL)	\neq	Porcentagem de células que continuaram aderidas	Porcentagem de células que se desprenderam
BMN	0,76	0,215	0,545	72	28
BMT	0,79	0,245	0,545	69	31

Tabela 2 - Resultado do desprendimento celular após imobilização. Valores iniciais foram obtidos pela quantidade de células imobilizadas no bagaço demonstrado na tabela 1, encontrados na coluna de diferença.

5.2. Fermentação láctica

5.2.1. Aderência das células no bagaço de malte

A fermentação foi realizada em duplicatas (amostra A1 e amostra A2, para células imobilizadas e amostra B1 e amostra B2, para células livres), os resultados foram analisados individualmente devido à diferença no resultado de imobilização de células no bagaço. O resultado da aderência das bactérias lácticas no bagaço foi de 25% de células aderidas na amostra 1 e 43% na amostra 2. O resultado foi calculado em função da massa seca de células no meio líquido.

Os resultados da imobilização se mostraram diferentes dos que foram encontrados anteriormente, por esse motivo é possível sugerir que o método escolhido para quantificação celular não é o ideal. Como já dito anteriormente, possivelmente a separação de células e micropartículas do bagaço não aconteceu de maneira satisfatória. Outro fator que pode ter corroborado para o resultado encontrado é a utilização de um meio de propagação e fonte de bactéria diferente do experimento para análise da imobilização celular. Entretanto é possível afirmar que ocorre imobilização celular no bagaço de malte.

5.2.2. Fermentação

5.2.2.1. Análise de pH

Os resultados de pH da fermentação láctica demonstraram que a fermentação contendo as células imobilizadas obteve um pH mais ácido após as 24h, como demonstrado na Tabela 3. Com esse resultado, é possível dizer que a imobilização proporcionou uma proteção para as células imobilizadas, permitindo que houvesse uma maior acidificação do meio. O que significa que as bactérias lácticas puderam continuar produzindo ácido láctico, mesmo em um pH desfavorável, já que o pH ótimo para bactéria láctica produzir o ácido varia entre 6,4 e 4,5 (Ozogul e Hamed, 2016).

pH das amostras				
	Células imobilizadas		Células livres	
Tempo	Amostra A1	Amostra A2	Amostra B1	Amostra B2
0h	6,16	6,2	6,22	6,24
3h	6,45	6,51	5,93	5,9
6h	6,51	6,57	6,18	6,23
8h	6,51	6,5	6,19	6,11
24h	3,49	3,5	4,77	4,83

Tabela 3 - Valores de pH das amostras durante o experimento. As células imobilizadas apresentaram um pH menor após as 24h de fermentação em comparação as células livres.

5.2.2.2. Acidez titulável expressa em ácido láctico

O perfil de evolução da acidez titulável nas amostras é apresentado na Figura 11. É possível ratificar o que foi afirmado no item anterior. A fermentação com as células imobilizadas no bagaço de malte teve uma produção de ácido láctico maior do que a fermentação por células livres, indicando que o bagaço confere uma proteção para as células de bactérias imobilizadas.

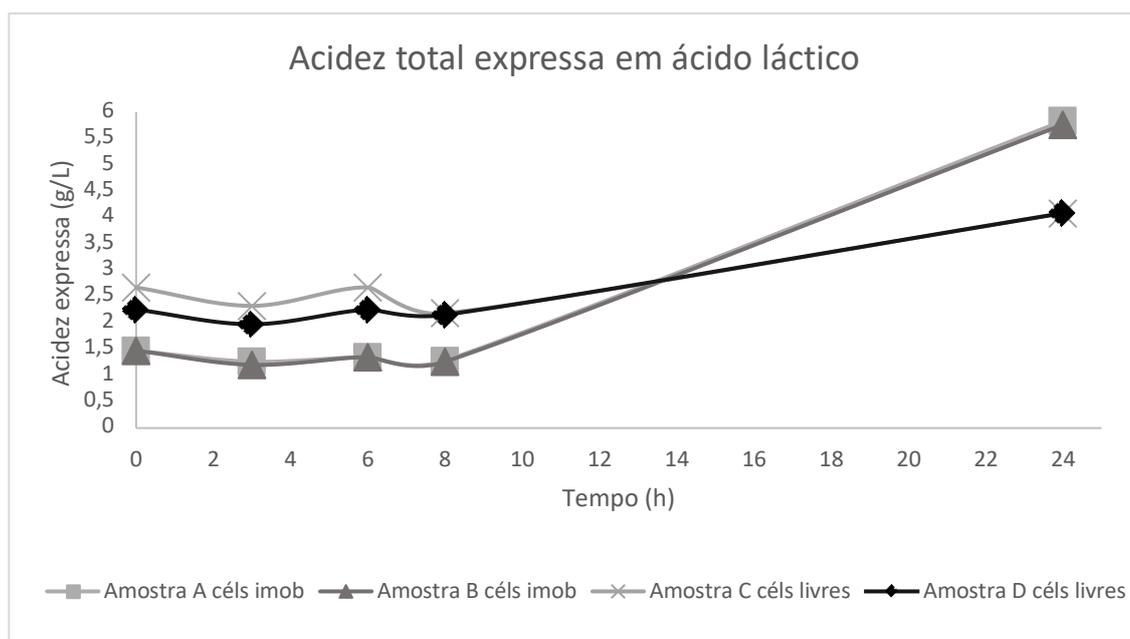


Figura 11 – Quantificação da acidez total expressa em ácido láctico.

A Tabela 4 apresenta os valores finais de acidez expressa em ácido láctico e de eficiência da fermentação.

	Células imobilizadas		Células livres	
	Amostra A1	Amostra A2	Amostra B1	Amostra B2
Acidez expressa em ácido láctico após 24h (g/L)	5,83	5,76	4,08	4,08

Tabela 4 - Valores de acidez obtidos após a fermentação da bactéria *Lactobacillus acidophilus* no meio de cultivo MRS.

Os valores obtidos pela fermentação da bactéria láctica para produção de ácido láctico são mais satisfatórios do que valores já relatados na literatura, onde igualmente não houve um tamponamento do meio, que será discutido mais adiante. Mathias (2015) relatou uma produção de 2,5g/L de ácido láctico como produto da fermentação láctica de *L. delbruecki subsp. delbruecki*. Esses resultados são favoráveis, pois mostra que a fermentação foi bem-sucedida.

Lopes (2008) relatou em seu estudo um resultado de 5,85g/L de ácido láctico como produto da fermentação da bactéria *L. fermentum* em meio MRS modificado em condição estática, sem enriquecimento, temperatura de 30°C, por 72 h com células livres. Os valores encontrados no presente trabalho para a fermentação com células livres foram ligeiramente inferiores, porém não discrepantes. Entretanto, os valores obtidos para a fermentação com células imobilizadas foram semelhantes.

Vale ressaltar que não foi realizada a otimização do meio de fermentação escolhido para o trabalho. O meio utilizado é um meio sintético com o básico necessário para atividade da bactéria láctica (Miller et al., 2017). É possível que haja o enriquecimento do meio de fermentação, utilizando outros componentes ou até mesmo outras matérias primas, como os próprios resíduos cervejeiros. O *trub* quente e a levedura residual possuem um alto valor nutricional, podendo ser consumidos pela bactéria láctica, tornando favorável a produção (Paz et al., 2018; Mathias et al., 2017). Outros resíduos interessantes de aplicação são o soro de leite (Kumar et al., 2014) ou material hidrolisado de resíduos da agroindústria (Zhang et al, 2014; Liang, McDonald e Coats, 2014; Ouyang et al, 2013).

Outro fator que pode ser melhor explorado para que haja um melhor resultado na produção de ácido láctico é tensão de oxigênio no meio de fermentação. Como já dito, a fermentação ocorreu com rotação de 70 rpm em uma estufa que não era hermeticamente fechada. Devido à essas condições, a quantidade de O₂ incorporada ao meio de fermentação provavelmente se manteve alta. As bactérias lácticas são predominantemente anaeróbicas, sendo assim, sua atividade foi prejudicada (Ozogul e Hamed, 2016). Porém, a baixa rotação foi necessária para que as células imobilizadas no bagaço de malte pudessem ter maior contato com o meio, já que o bagaço tende a se depositar no fundo do recipiente, fazendo com que algumas células não entrem em contato com o meio caso

não tenha uma rotação mínima. Uma possível solução seria a utilização de uma estufa com rotação, onde a quantidade de O₂ e CO₂ pudesse ser controlada.

Para além disso, não houve a verificação da fase de crescimento da bactéria láctica inoculada, de forma que não foi possível determinar se a bactéria se encontrava em sua fase exponencial, que seria a ideal, ou em sua fase estacionária, na qual a bactéria já não se encontra em plena atividade. Como a fermentação se deu em caráter experimental, como forma de analisar a eficácia da imobilização celular, foi visado que houvesse uma maior concentração celular. Porém, é necessário que haja a construção da curva cinética de crescimento da bactéria a ser utilizada na fermentação, para que a fase exponencial possa ser conhecida e assim utilizada para padronização do inóculo.

Outro fator que sustentou a baixa eficiência encontrada e baixa produção de ácido láctico foi a não realização do tamponamento do meio ou o controle de pH. Sabe-se que a produção de ácidos orgânicos reduz o pH do meio alterando as condições de fermentação. O tamponamento ou controle do pH tendem a estender a atividade microbiana, aumentando a produção total de ácido láctico. Nguyen e colaboradores (2013) obtiveram cerca de 123 g/L de ácido láctico na fermentação de *L. paracasei* em um meio enriquecido com batata doce, utilizando CaCO₃ para controle do pH. Shi e colaboradores (2012), que estudaram a produção de ácido láctico via fermentação de *L. lactis* em um meio enriquecido com alcachofra, obtiveram 93 g/L de ácido láctico utilizando NaOH para controlar o pH.

6. Considerações finais

Os resultados obtidos permitiram concluir que:

- O uso do bagaço de malte como suporte para imobilização celular é eficaz;
- São necessários novos estudos para que seja possível uma quantificação mais exata de células imobilizadas no suporte;
- Pré-tratamentos no bagaço de malte aumentam sua porosidade tornando-o mais eficiente para imobilização celular, porém, o uso de bagaço não tratado também apresentou bons resultados de imobilização. É necessário o desenvolvimento de novos estudos que permitam explorar melhor as condições de tratamento do bagaço;
- A fermentação por células imobilizadas foi mais bem-sucedida do que a fermentação por células livres, constatando que a imobilização em bagaço de malte confere uma proteção para célula imobilizada;
- Ademais, as condições de fermentação, como tensão de O₂, tamponamento do meio ou controle de pH, condição fisiológica do inóculo, são fatores importantes e necessitam ser melhor estudados em trabalhos futuros.

7. Referência

ABDEL-RAHMAN, Mohamed Ali et al. Highly efficient L-lactic acid production from xylose in cell recycle continuous fermentation using *Enterococcus mundtii* QU 25. **Rsc Advances**, San Diego, v. 2, n. 1, p.1-33, 25 jan. 2016.

ALIYU, Salihu; BALA, Muntari. Brewer's spent grain: A review of its potentials and applications. **African Journal Of Biotechnology**, Nigeria, v. 10, n. 3, p.324-331, 17 jan. 2011.

AOAC. Association of Official Agricultural Chemists. **Official Methods of Analysis**. 15th ed., Washington, D. C., 1975.

ASO, Yuji et al. Continuous production of d-lactic acid from cellobiose in cell recycle fermentation using β -glucosidase-displaying *Escherichia coli*. **Journal Of Bioscience And Bioengineering**, [s.l.], v. 127, n. 4, p.441-446, abr. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2018.09.011>.

BARBOSA, Samara Jéssica et al. Cerveja artesanal de alta fermentação adicionada de hibisco (*Hibiscus sabdariffa*). **Tópicos em Ciências e Tecnologia de Alimentos: Resultados de Pesquisas Acadêmicas - Vol. 3**, [s.l.], 18 set. 2017. Editora Blucher. <http://dx.doi.org/10.5151/9788580392722-11>.

BOSHAGH, Fatemeh; ROSTAMI, Khosrow; MOAZAMI, Nasrin. Biohydrogen production by immobilized *Enterobacter aerogenes* on functionalized multi-walled carbon nanotube. **International Journal Of Hydrogen Energy**, [s.l.], v. 44, n. 28, p.14395-14405, maio 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.11.199>.

BRÁNYIK, Tomáš et al. Continuous Beer Fermentation Using Immobilized Yeast Cell Bioreactor Systems. **Biotechnology Progress**, [s.l.], v. 21, n. 3, p.653-663, 5 set. 2008. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1021/bp050012u>.

BRÁNYIK, Tomás et al. Continuous immobilized yeast reactor system for complete beer fermentation using spent grains and corncobs as carrier materials. **J Ind Microbiol Biotechnol**, Braga, v. 33, n. 1, p.1010-1018, 12 jun. 2006.

BRÁNYIK, Tomáš et al. Continuous Primary Fermentation of Beer with Yeast Immobilized on Spent Grains—The Effect of Operational Conditions. **Journal Of The American Society Of Brewing Chemists**, [s.l.], v. 62, n. 1, p.29-34, jan. 2004. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1094/asbcj-62-0029>.

BRÁNYIK, Tomáš et al., Continuous Beer Fermentation Using Immobilized Yeast Cell Bioreactor Systems. *Biotechnology Progress*, v. 21(3), p.653–663, ago. 2005 doi:10.1021/bp050012u

BUDRYN, Grażyna et al. Lactic acid fermentation of legume seed sprouts as a method of increasing the content of isoflavones and reducing microbial contamination. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 285, p.478-484, jul. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.178>.

CIPOLATTI, Eliane Pereira et al. Support engineering: relation between development of new supports for immobilization of lipases and their applications. **Biotechnology Research And Innovation**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.26-34, jan. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biori.2017.01.004>.

COVIZZI, Luiz Gustavo et al. Immobilization of microbial cells and their biotechnological applications. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 28, n. 2, p.143-160, 2007.

DRAGONE, Giuliano; MUSSATTO, Solange I. Inovações na produção de cervejas: Fermentação contínua utilizando leveduras imobilizadas em suporte natural obtido a partir do bagaço de malte. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, São Paulo, v. 35, n. 1, p.48-51, jan. 2005.

DRAGONE, Giuliano; MUSSATTO, Solange Inês; SILVA, João Batista de Almeida e. Use of concentrated worts for high gravity brewing by continuous process: new tendencies for the productivity increase. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 27, p.37-40, ago. 2007.

EŞ, Ismail et al. Recent advancements in lactic acid production - a review. **Food Research International**, [s.l.], v. 107, p.763-770, maio 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2018.01.001>.

FASCHIAN, R; PÖRTNER, R, Multi-fixed-bed bioreactor system applied for bioprocess development of immobilized lactic acid bacteria. **The Open Biotechnology Journal**, 10, 1–9. (2016).

GANGIREDLA et al. Fifty-six draft genome sequences of 10 Lactobacillus species from 22 commercial dietary supplements. **Genome Announc**, Ni, v. 00621-18, n. 6, p.1-3, jun. 2018.

HASAN, Md Zobaer et al. Transcriptional profiling of lactic acid treated reconstructed human epidermis reveals pathways underlying stinging and itch. **Toxicology In Vitro**, [s.l.], v. 57, p.164-173, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2019.03.005>.

JAYANT, M. et al. Brewer's spent grains (BSGs) as feedstuff for striped catfish, Pangasianodon hypophthalmus fingerlings: An approach to transform waste into wealth. **Journal Of Cleaner Production**, [s.l.], v. 199, p.716-722, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.07.213>.

Joh Barth. **THE BARTH - REPORT: HOPS 2017/2018**. Nuremberg: Georgensgmund, 2018.

KARAGOZ, Pınar; BILL, Roslyn M.; OZKAN, Melek. Lignocellulosic ethanol production: Evaluation of new approaches, cell immobilization and reactor configurations. **Renewable Energy**, [s.l.], v. 143, p.741-752, dez. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.renene.2019.05.045>.

KIM, Jong Ki; ABDELHAMID, Mohamed A.a.; PACK, Seung Pil. Direct immobilization and recovery of recombinant proteins from cell lysates by using EctP1-peptide as a short fusion tag for silica and titania supports. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 135, p.969-977, ago. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.05.105>.

KUMAR, Gopalakrishnan et al. Recent insights into the cell immobilization technology applied for dark fermentative hydrogen production. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 219, p.725-737, nov. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2016.08.065>.

LEE, Ja Hyun et al. Biodiesel production by lipases co-immobilized on the functionalized activated carbon. **Bioresource Technology Reports**, [s.l.], v. 7, p.100248, set. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biteb.2019.100248>.

LI, Zhuoyang et al. Inactivation of Salmonella Enteritidis on eggshells by lactic acid spray. **Food Control**, [s.l.], v. 104, p.201-207, out. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.04.046>.

LUFT, Luciana et al. Transformation of residual starch from brewer's spent grain into fermentable sugars using supercritical technology. **The Journal Of Supercritical Fluids**, [s.l.], v. 140, p.85-90, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2018.06.006>.

MAJUMDAR, Subhasree et al. Exploring Planococcus sp. TRC1, a bacterial isolate, for carotenoid pigment production and detoxification of paper mill effluent in immobilized fluidized bed reactor. **Journal Of Cleaner Production**, [s.l.], v. 211, p.1389-1402, fev. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.11.157>

MALLEN, Elliot; NAJDANOVIC-VISAK, Vesna. Brewers' spent grains: Drying kinetics and biodiesel production. **Bioresource Technology Reports**, [s.l.], v. 1, p.16-23, mar. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biteb.2018.01.005>.

MARQUES, S. et al. Lactic acid production from recycled paper sludge: Process intensification by running fedbatch into a membrane-recycle bioreactor. **Biochemical Engineering Journal**, 120, 63–72. 2017.

MATHIAS, Thiago Rocha dos Santos et al. Brewery Wastes Reuse for Protease Production by Lactic Acid Bacteria Fermentation. **Food Technology And Biotechnology**, [s.l.], v. 55, n. 2, p.218-224, 2017. Food Technology and Biotechnology Journal. <http://dx.doi.org/10.17113/ftb.55.02.17.4378>.

MATHIAS, Thiago Rocha dos Santos. **APROVEITAMENTO BIOTECNOLÓGICO DE RESÍDUOS INDUSTRIAIS CERVEJEIROS**. 2015. 198 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2015.

MENDES, Adriano Aguiar. **Seleção de suportes e protocolos de imobilização de lipases para a síntese enzimática de biodiesel**. 2009. 225 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

MILLER, C. et al. Industrial Production of Lactic Acid ☆. **Reference Module In Life Sciences**, [s.l.], 2017. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-809633-8.09142-1>.

MLADENOVÍĆ, Dragana et al. Lactic acid production on molasses enriched potato stillage by *Lactobacillus paracasei* immobilized onto agro-industrial waste supports. **Industrial Crops And Products**, [s.l.], v. 124, p.142-148, nov. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.07.081>.

MUSSATTO, S.i.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I.c.. Brewers' spent grain: generation, characteristics and potential applications. **Journal Of Cereal Science**, [s.l.], v. 43, n. 1, p.1-14, jan. 2006. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcs.2005.06.001>.

MUSSATTO, Solange I. et al. Brewer's spent grain as raw material for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii*. **Biotechnol Lett**, Vicoso, v. 29, p.1973-1976, 14 ago. 2007.

NIKOLAOU, Anastasios et al. Wine production using free and immobilized kefir culture on natural supports. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 272, p.39-48, jan. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.08.015>.

OECD (2019), "Alcohol consumption" (indicator), <https://doi.org/10.1787/e6895909-en> (accessed on 24 June 2019).

OLIVEIRA, Regiane Alves de et al. Polymer grade l-lactic acid production from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate using *Bacillus coagulans*. **Bioresource Technology Reports**, [s.l.], v. 6, p.26-31, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biteb.2019.02.003>.

OZOGUL, Fatih; HAMED, Imen. Lactic Acid Bacteria: *Lactobacillus* spp.. **Reference Module In Food Science**, [s.l.], 2016. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.00852-0>.

PAZ, Alicia et al. Using brewer's spent grain to formulate culture media for the production of bacteriocins using Patagonian strains. **Lwt**, [s.l.], v. 96, p.166-174, out. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2018.05.027>.

PILKINGTON et al., Fundamentals of immobilized yeast cells for continuous beer fermentation: A review. **Journal of the Institute of Brewing**, London, v. 104, p. 19-31, 1998.

PIMTONG et al., Enhanced effectiveness of *Rhizopus oryzae* by immobilization in a static bed fermentor for L-lactic acid production. **Process Biochemistry**, 52, 44–52, 2017.

PINHEIRO, Bruna B. et al. Chitosan activated with divinyl sulfone: a new heterofunctional support for enzyme immobilization. Application in the immobilization of lipase B from *Candida antarctica*. **International Journal Of Biological Macromolecules**, [s.l.], v. 130, p.798-809, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.02.145>.

PLESSAS, S et al. Immobilization of kefir and *Lactobacillus casei* on brewery spent grains for use in sourdough wheat bread making. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 105, n. 1, p.187-194, 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.065>

RAVINDRAN, Rajeev et al. Improving enzymatic hydrolysis of brewer spent grain with nonthermal plasma. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 282, p.520-524, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2019.03.071>.

REDDY et al., L-Lactic acid production by combined utilization of agricultural bioresources as renewable and economical substrates through batch and repeated-batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1. **Bioresource Technology**, 209, 187–194 2016.

RODRIGUES, Rafael C. et al. Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. **Biotechnology Advances**, [s.l.], abr. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.04.003>.

SILVA, Andreia Machado da et al. Immobilization of commercial laccase on spent grain. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 47, n. 7, p.1095-1101, jul. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2012.03.021>.

SIQUEIRA, Priscila Becker. **Estudo da cinética bioquímica e sensorial de diferentes tipos de cervejas brasileiras**.2007. 125 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

STATISTA. **Beer worldwide**. Disponível em: <https://www.statista.com/outlook/10010000/100/beer/worldwide>

SUN, Yaqin et al. Efficient production of lactic acid from sugarcane molasses by a newly microbial consortium CEE-DL15. **Process Biochemistry**, [s.l.], v. 81, p.132-138, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2019.03.022>.

TSCHOPE, Ergon Carlos. **Microcervejarias e Cervejarias: a história, a arte e a tecnologia**. São Paulo: Aden Editora, 2001.

VERBELEN, Pieter J. et al. Immobilized yeast cell systems for continuous fermentation applications. **Biotechnology Letters**, [s.l.], v. 28, n. 19, p.1515-1525, 2 ago. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-006-9132-5>.

WANG et al., Improvement of L-lactic acid productivity from sweet sorghum juice by repeated batch fermentation coupled with membrane separation. **Bioresource Technology**, 211, 291–297. 2016.

WU, Bin et al. Expansin assisted bio-affinity immobilization of endoxylanase from *Bacillus subtilis* onto corncob residue: Characterization and efficient production of xylooligosaccharides. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 282, p.101-108, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.004>.

WU, Bin et al. Expansin assisted bio-affinity immobilization of endoxylanase from *Bacillus subtilis* onto corncob residue: Characterization and efficient production of xylooligosaccharides. **Food Chemistry**, [s.l.], v. 282, p.101-108, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.004>.

ZHANG, Cunsheng et al. Immobilization of *Clostridium kluyveri* on wheat straw to alleviate ammonia inhibition during chain elongation for n-caproate production. **Environment International**, [s.l.], v. 127, p.134-141, jun. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2019.03.032>.