UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

ESCOLA DE QUÍMICA

THIAGO ROCHA DOS SANTOS MATHIAS

APROVEITAMENTO BIOTECNOLÓGICO DE RESÍDUOS INDUSTRIAIS CERVEJEIROS

Tese de Doutorado

RIO DE JANEIRO
2015

THIAGO ROCHA DOS SANTOS MATHIAS

APROVEITAMENTO BIOTECNOLÓGICO DE RESÍDUOS INDUSTRIAIS CERVEJEIROS

Tese de Doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, da Escola de Química, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências (D. Sc.).

Orientadores:
Profa. Dra. Eliana Flavia Camporese Sérvulo
Prof. Dr. João Batista de Almeida e Silva
Profa. Dra. Paula Fernandes de Aguiar

RIO DE JANEIRO
2015

FICHA CATALOGRÁFICA

RM4262
a

Rocha dos Santos Mathias, Thiago
Aproveitamento biotecnológico de resíduos industriais cervejeiros / Thiago Rocha dos Santos Mathias. -- Rio de Janeiro, 2015.
198 f.

Orientadora: Eliana Flávia Camporese Sérvulo.
Coorientador: João Batista de Almeida e Silva
Coorientadora: Paula Fernandes de Aguiar.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, 2015.

1. resíduos cervejeiros. 2. aproveitamento. 3. fermentação láctica. 4. proteases. 5. mostura. I. Flávia Camporese Sérvulo, Eliana, orient. II. Fernandes de Aguiar, Paula, coorient. III. Título.

Thiago Rocha dos Santos Mathias

APROVEITAMENTO BIOTECNOLÓGICO DE RESÍDUOS INDUSTRIAIS CERVEJEIROS

Tese de Doutorado submetida ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Escola de Química/UFRJ, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Aprovado por:

Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D. Sc. (Orientadora) – Escola de Química/UFRJ

João Batista de Almeida e Silva, D.Sc. (Orientador) – Escola de Engenharia/USP

Paula Fernandes de Aguiar, D.Sc. (Orientadora) – Instituto de Química/UFRJ

Antonio Tavares da Silva, D.Sc. – SENAI/Vassouras

Flavio Luís Schmidt, D.Sc. – FEA/UNICAMP

Karen Signori Pereira, D.Sc. – Escola de Química/UFRJ.

Maria Antonieta Peixoto Gimenes Couto, D.Sc. – Escola de Química/UFRJ.

Verônica Ferreira Melo, D.Sc. – IFRJ.

Rio de Janeiro, 08 de maio de 2015.

“E não há salvação em nenhum outro; porque abaixo do céu não há nenhum outro nome, dado entre os homens, pelo qual importa que sejamos salvos” (Senão pelo nome de Jesus).

Pedro, o discípulo, sobre Jesus, o Cristo.

Atos 4.12 / Bíblia

Ao meu irmão, Jeremias, que faz quase o impossível para tornar a minha vida mais possível.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao longo de pouco mais de 4 anos de um doutorado, foi possível confirmar uma experiência que eu já trazia de outros momentos da vida. Essa experiência que diz: “sozinho, seria impossível”. Não posso minimizar o meu trabalho, mas não posso fingir que se cada pessoa que esteve presente de alguma forma, este trabalho não estaria aqui. Tento expressar, em poucas palavras, o meu agradecimento.

Para o meu Deus, não são meras palavras de agradecimento, mas um sentimento, que enche o peito: GRATIDÃO. Meu maior amor e motivo. Não importa quantos títulos eu tiver, isto não muda! Não veio de mim, mas dele, que me amou primeiro!

Em meio de toda essa trilha profissional conquistei muitas coisas. Mas, um presente eu ganhei, e foi além de tudo isso. A melhor orientadora, como uma mãe, que acreditou, investiu, cuidou, se dedicou, corrigiu, preparou, treinou. Um dia me disse: “vou te dar uma notícia, não sei se boa ou ruim... Você vai ser professor”. Eliana Flávia, eternamente exemplo, eu te amo! Obrigado por tudo.

À professora Paula Fernandes de Aguiar, que entrou na minha vida quando o doutorado estava mais ou menos na metade. Mas não deixou nada a desejar! Obrigado pela orientação e pela paciência pra ensinar planejamento experimental para um engenheiro enrolado; pelos cafés, almoços, chocolates, histórias divertidas. Muito grato, mesmo!

Ao professor João Batista, pela orientação, mesmo que à distância, se propôs a contribuir para a execução do trabalho e discussão dos resultados.

À minha família, SEMPRE presente em todos os momentos. Apoio moral, apoio físico, apoio financeiro, apoio emocional. Meu alicerce. Meu irmão Jeremias, mãe Lídia, tia Cássia, Vó Ezér, e todos os meus primos, primas, tios e tias que participaram disso.

À Veronica Ferreira, por toda amizade. A vida deu muitas voltas e graças a Deus hoje não somos apenas colegas de trabalho, mas amigos. Faz o meu trabalho parecer bem mais leve e divertido.

À toda equipe do IFRJ, que apoiou e compreendeu todos os momentos de correria, pela grande ajuda para desenvolver o trabalho e pela amizade. O café, a troca de experiências, os conselhos, os ensinamentos. Todos, sem exceção, mas não poderia deixar de citar José Ricardo, Angélica Oliveira, Fernanda Kamp, Lourdes Masson e Denise Bouts, que moram no meu coração.

À Catarina Amorim e Matheus Cortes, do IFRJ, pelo incrível apoio e dedicação na produção e análise das cervejas. A persistência para fazer as "benditas triplicatas" e repetir experimentos perdidos por problemas de infraestrutura. E, claro, pela incrível amizade que surgiu ao longo do trabalho! Os almoços, as saídas, as "sensoriais", e muito mais.

Aos fantásticos profissionais do SENAI / Vassouras, pelo apoio técnico e instrução no decorrer de todo o trabalho e pelo grande ensinamento não apenas sobre cerveja, mas de experiências de sua vida profissional. Muito agradecido, em especial, aos professores Pedro Paulo de Mello e Henrique Trancoso, e ao técnico em alimentos Aurélio Miguel.

Aos meus pra sempre amigos, sem mudar, que ainda na faculdade se tornaram parte das pessoas mais importantes da minha vida. Outra família, chamada JJ. Bob (às vezes Bruno), Eliene, Christiane, Lívia, Marina e Myrlla.

Aos amigos do laboratório E-107 e dos laboratórios vizinhos, por toda ajuda e por fazerem o ambiente de trabalho agradável.

À Veronica Marinho e toda equipe do Laboratório de Tecnologia Ambiental (E-115), em especial, pela grande contribuição técnica, pelas conversas, pelos desabafos!

À todos os meus amigos, uma família que eu pude escolher, ou que me escolheram. Presentes em todos os momentos, divertidos ou de problemas. Quem faz parte, sabe.

Aos meus alunos, principalmente os que desde sempre fizeram questão de migrar da relação professor/aluno para a relação de amizade! Os que desde 2012 marcaram minha vida com homenagens inesquecíveis! Todo o conhecimento que adquiri, seja em minha formação ou em minha vida; faço questão de passar e eles sempre tão abertos para receber. É uma troca incrível!

À Bianca Fernandes, que faz o seu trabalho com excelência e me ajuda muito. Uma ajuda que não tem preço.

À Priscila Carrilho, que surgiu na minha vida como um presente, um refrigério. Em tão pouco tempo, mas o suficiente para marcar minha vida e essa caminhada, essa reta final do doutorado. Não poderia faltar essa linha especial para você.

Aos professores da Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos (EQ/UFRJ), pela contribuição para minha formação profissional.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

RESUMO

MATHIAS, Thiago Rocha dos Santos. Aproveitamento biotecnológico de resíduos industriais cervejeiros. Rio de Janeiro, 2015. Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos – Escola de Química/UFRJ.

Orientadores:
Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D.Sc.;
João Batista de Almeida e Silva, D.Sc.;
Paula Fernandes de Aguiar, D.Sc.

Palavras-chave: resíduos cervejeiros; fermentação láctica; proteases; mostura.

A cerveja, obtida a partir da fermentação alcoólica de mosto elaborado com malte de cevada e lúpulo, adicionado ou não de adjuntos (fontes substitutas de carbono), gera, em seu processo de produção, diferentes resíduos - bagaço de malte, *trub* quente e levedura residual cervejeira (LRC) - de importância em volume e carga orgânica. Este trabalho teve por objetivo avaliar o emprego destes resíduos para produção de extrato enzimático rico em atividade proteolítica pelo cultivo de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, cultura reconhecida como GRAS. Para tanto, os três resíduos tiveram sua composição determinada em função dos teores de umidade, cinzas, carbono total e solúvel, nitrogênio total e solúvel, proteínas bruta e solúvel, aminoácidos (FAN – *free amino nitrogen*) e açúcares redutores; bem como caracterizados quanto ao pH, à acidez titulável total e à demanda química oxigênio. A partir de um planejamento experimental de misturas, foi observado que todos os resíduos permitiram crescimento da cultura láctica, embora só tenha sido detectada atividade proteolítica expressiva (1,98 U/mL) no extrato bruto de meios formulados exclusivamente com LRC (4% de proteínas). Foi possível incrementar a atividade proteolítica (4,9 U/mL) pelo ajuste do teor proteico (6% m/v), com adição de glicose (6% m/v), estabelecidos com base em um planejamento fatorial. Neste caso, determinou-se que a concentração de proteínas apresentou maior efeito sobre a produção de proteases do que a concentração de glicose. O extrato bruto parcialmente purificado por precipitação com etanol apresentou atividade de 145,5 U/g de precipitado proteico. O extrato proteolítico, parcialmente purificado, foi utilizado (0,75 U/g de malte) na produção de mostos cervejeiros. A análise comparativa dos mostos revelou que a adição de extrato proteolítico durante a mostura teve efeito positivo com aumento dos teores de extrato, de nitrogênio total e de aminoácidos (FAN). Ademais, os eletroferogramas indicaram alterações no perfil qualitativo e quantitativo de aminoácidos. As cervejas assim produzidas pouco se diferenciaram quanto ao teor de etanol (valor médio de 3,7% v/v), embora as eficiências de fermentação tenham variado de 91 a 98%; o valor máximo correspondente à cerveja produzida a partir do mosto suplementado com proteases. Observou-se, ainda, redução da massa de material coagulável presente, que foi maior para os dois mostos adicionados de proteases exógenas. Os resultados indicam o emprego do resíduo cervejeiro (LRC) para produção de proteases por cultura láctica, com potencial aplicação no processo cervejeiro, embora seja vasta a possibilidade de aplicação na indústria de bioprocessos e de alimentos.

ABSTRACT

MATHIAS, Thiago Rocha dos Santos. Biotechnological utilization of brewery industrial wastes. Rio de Janeiro, 2015. Doctoral Thesis submitted to Graduate Program in Technology of the Chemicals and Biochemicals Process – Escola de Química/UFRJ.

Advisors:
Eliana Flávia Camporese Sérvulo, D.Sc.;
João Batista de Almeida e Silva, D.Sc.;
Paula Fernandes de Aguiar, D.Sc.

Key words: Brewery wastes; lactic fermentation; proteases; mashing.

Beer, beverage obtained from alcoholic fermentation of wort prepared with barley malt and hops, supplemented or not with adjuncts (carbon substitute fonts), generates in its production process, three different wastes – brewer spent grain, hot trub and residual yeast (LRC) – important in volume and organic load. This study aimed to evaluate the use of these residues for the production of enzyme extract rich in proteolytic activity by cultivation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, microbial culture recognized as GRAS. Therefore, the three residues had their composition determined in terms of moisture, ash, total and soluble carbon, total and soluble nitrogen, crude and soluble proteins, amino acids (FAN - free amino nitrogen) and reducing sugars; and were analyzed by pH, total acidity and chemical oxygen demand values. From an experimental design of mixtures, it was observed that the three waste allowed the growth of lactic culture, although it was detected significant proteolytic activity (1.98 U/ml) only in the crude extract of media formulated exclusively with LRC (4% proteins). It was possible to increase the proteolytic activity (4.9 U/ml) by adjusting the protein content (6% w/v) and addition of glucose (6% w/v) based on a factorial experimental design. In this case, it was determined that the protein concentration showed higher effect on proteases release than the concentration of glucose. The partially purified extract by ethanol precipitation showed activity of 145,5 U/g of protein precipitate. The proteolytic extract, partially purified, was used (0.75 U/g malt) to produce brewers worts. The comparative analysis of worts showed that the addition of proteolytic extract during the mash had a positive effect with increasing of extract recovered, total nitrogen and amino acids (FAN). Furthermore, the electropherograms indicate changes in the qualitative and quantitative amino acid profile. The beers produced present little differences in ethanol content (mean value of 3.7% v/v), although the fermentation efficiencies have varied from 91 to 98%; the maximum value was obtained for beer produced from the wort supplemented with proteases. It was still observed a reduction of the mass of coagulable material content, which was higher (the reduction) for the two worts added by exogenous proteases. The results indicate the use of the residual brewing yeast (LRC) for protease production by lactic culture, with potential application in the brewing process, although the possibility of wide application in bioprocess and food industry.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIAÇÕES

%P – percentual de participação no fornecimento de proteínas ao meio

μ - taxa específica de crescimento

Abs – absorvância

AH – área do halo

AP – atividade proteolítica

ARs – Açúcar redutor solúvel

ART – açúcar redutor total

AT – área total

b_i – coeficientes do modelo matemático

BM – Bagaço de malte

BU – unidades de amargor

C/N – relação carbono/nitrogênio

CC – concentração celular

Ccont – cerveja controle

C_{cont} – cerveja controle

C_{prot} – cerveja em cujo preparo do mosto houve adição de extrato proteolítico

Cprot – cerveja produzida com adição de proteases

C_{total} – carbono total

Da – Dalton, unidade de massa molar

DNS – ácido di-nitrosalicílico

DO – densidade óptica

DQO – Demanda química de oxigênio

E_i – Experimento i

Er – extrato real

FAN – *free amino nitrogen*

g – aceleração da gravidade

LRC – Levedura residual cervejeira

MPC – massa do papel referente à colônia

MPCH – massa do papel referente à colônia + halo

$N_{solúvel}$ – nitrogênio solúvel

N_{total} – nitrogênio total

P_{AP} – produtividade de atividade proteolítica

PC – ponto central

PFFL – planejamento fatorial para fermentação láctica

P_{final} – produtividade média final

P_{max} – produtividade máxima

PMFL – Planejamento de misturas para fermentação láctica

Ps - proteína solúvel

RPM – rotações por minuto

tg – tempo de geração

TOC – Carbono orgânico total

Tp – taxa de formação de produto

TQ – *trub* quente

U – unidade de atividade enzimática

UFC – unidades formadoras de colônia

X_i – componente ou fator de estudo no planejamento experimental

y – resposta observada no planejamento experimental

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Quantidades de resíduos gerados pela indústria cervejeira no Brasil 24
Figura 3.1: Diagrama de blocos do processo cervejeiro..... 34
Figura 3.2: Fluxograma do processo cervejeiro e a geração de resíduos 52
Figura 3.3: Vias metabólicas simplificadas das bactérias homolácticas e heterolácticas. 65
Figura 3.4: Diagrama ternário do planejamento de composição de misturas..... 68
Figura 3.5: Área de estudo do planejamento fatorial de 2 níveis e 2 fatores..... 69
Figura 4.1: Diagrama de blocos resumido das análises dos resíduos cervejeiros..... 72
Figura 4.2: Secagem do bagaço de malte para armazenamento. 73
Figura 4.3: Bagaço de malte seco 73
Figura 4.4: Secagem do *trub* quente para armazenamento 74
Figura 4.5: Levedura residual cervejeira. 75
Figura 4.6: Separação da fração solúvel dos resíduos em água. 76
Figura 5.1: Etapas de ativação, propagação e conservação da cultura INCQS383 95
Figura 5.2: Morfologia microscópica das culturas coradas pela técnica de Gram..... 96
Figura 5.4: Cultivo das bactérias lácticas em meio MRS modificado 101
Figura 5.5: Curvas de crescimento dos cultivos de bactérias lácticas..... 102
Figura 5.5: Crescimento das bactérias lácticas em meio sólido MRS caseína. 105
Figura 5.6: Curva padrão da Abs x massa seca..... 107
Figura 6.1: Frascos Erlenmeyers para fermentação em *shaker* rotacional. 113
Figura 6.2: Perfis de evolução da acidez e do pH durante a fermentação láctica 114
Figura 6.3: Taxas médias de formação de produto. 116
Figura 6.4: Produtividade (expressa em ácido láctico) 120
Figura 6.5: Superfície de resposta para a acidez (expressa em ácido láctico) 124
Figura 6.6: Superfície de resposta para a produtividade (expressa em ácido láctico). 125
Figura 6.7: Superfície de resposta para a atividade proteolítica (U/mL) 135
Figura 7.1: Precipitação com etanol e recuperação das enzimas proteolíticas por filtração. 144
Figura 7.2: Redução do pH no meio em 6 h de fermentação. 145
Figura 7.2: Superfície de resposta para a atividade proteolítica (U/mL) 148
Figura 8.1: Matérias-primas e bioagente. 158
Figura 8.2: Purificação do extrato proteolítico por precipitação com etanol. 159
Figura 8.3: Mostura em escala de laboratório. 160
Figura 8.4: Curvas de mostura..... 161
Figura 8.5: Bagaço de malte retido durante a clarificação do mosto doce. 162
Figura 8.6: Cocção dos diferentes mostos elaborados. 163
Figura 8.7: Produção da cerveja. 163
Figura 8.8: Teste de iodo nos diferentes meios de mostura..... 165
Figura 8.9: Eletroferogramas dos mostos obtidos em 195 nm. 169
Figura A1: Curva padrão do método do DNS 197

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Composição química da cevada....31
Tabela 3.2: Matriz do planejamento de misturas....67
Tabela 3.3: Matriz codificada do planejamento fatorial de 2 fatores em 2 níveis....69
Tabela 4.1: Teor de umidade dos resíduos....80
Tabela 4.2: Teor de cinzas dos resíduos....81
Tabela 4.3: Teor de açúcares redutores livres solúveis dos resíduos....83
Tabela 4.4: Teor de carbono total dos resíduos....84
Tabela 4.5: Teor de nitrogênio total e solúvel dos resíduos....85
Tabela 4.6: Teor de aminoácidos da fração solúvel dos resíduos....87
Tabela 4.7: pH e acidez titulável total dos resíduos....88
Tabela 4.8: Demanda química de oxigênio das frações sólida e solúvel dos resíduos....89
Tabela 5.1: Culturas de bactérias lácticas para avaliação da atividade proteolítica....93
Tabela 5.2: Parâmetros cinéticos de crescimento microbiano....103
Tabela 5.3: Correlação entre absorbância e massa seca de células....104
Tabela 5.4: Parâmetros de avaliação da atividade proteolítica das culturas lácticas....106
Tabela 6.1: Formulação dos meios do planejamento experimental de mistura....112
Tabela 6.2: Composição dos meios do planejamento experimental de misturas....112
Tabela 6.3: Taxas médias de formação de produto (acidez expressa em ácido láctico)....115
Tabela 6.4: Teste de Tukey para acidez....118
Tabela 6.5: Valores de pH ao final da fermentação láctica....119
Tabela 6.6: Teste de Tukey para produtividade de acidez....121
Tabela 6.7: Produtividade final (expressa em ácido láctico)....122
Tabela 6.8: Modelos matemáticos Acidez e Produtividade – Planejamento de Misturas....122
Tabela 6.9: Valores de acidez e produtividade medidos e previstos pelos modelos....123
Tabela 6.10: Atividade proteolítica e produtividade dos extratos brutos....131
Tabela 6.11: Modelo matemático Atividade Proteolítica - Planejamento de misturas....133
Tabela 6.12: Valores de atividade proteolítica medidos e previstos pelo modelo....134
Tabela 7.1: Experimentos do planejamento fatorial de 2 níveis e 2 fatores....140
Tabela 7.2: Composição dos meios do planejamento experimental de misturas....141
Tabela 7.3: Atividade proteolítica dos extratos brutos....146
Tabela 7.4: Modelo matemático Atividade Proteolítica - planejamento fatorial....146
Tabela 7.5: Valores de atividade proteolítica medidos e previstos pelo modelo....146
Tabela 7.6: Efeito de bloco....150
Tabela 7.7: Atividades proteolíticas dos extratos brutos e produtividade....150
Tabela 8.1: Planejamento experimental para produção dos mostos cervejeiros....159
Tabela 8.2: Caracterização dos mostos doces....167
Tabela 8.3: Caracterização das cervejas....169

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1: Principais componentes presentes nos resíduos cervejeiros 25
Quadro 3.1: Potenciais aplicações do bagaço de malte 54
Quadro 3.2: Potenciais aplicações da levedura residual cervejeira 59
Quadro 6.1: Resumo de trabalhos da literatura sobre produção de ácido láctico 130
Quadro 7.1: Resumo de trabalhos da literatura sobre produção de proteases 154
Quadro 7.2: Resumo de trabalhos da literatura sobre produção de proteases por fermentação no estado sólido (FES) 155

SUMÁRIO

Capítulo 1 20
Apresentação do Trabalho 20
1.1 Estrutura do trabalho 20
1.2 introdução e justificativa 21
Capítulo 2 27
Objetivo Geral 27
Capítulo 3 28
Revisão Bibliográfica 28
3.1 CERVEJA 29
3.1.1 Definição 29
3.1.2 Histórico e Mercado 29
3.1.3 Matérias-primas cervejeiras 30
3.1.4 Agentes de fermentação 32
3.1.5 Processo Cervejeiro 33
3.1.5.1 Malteação 34
3.1.5.2 Moagem 35
3.1.5.3 Brassagem 35
3.1.5.4 Resfriamento e aeração 38
3.1.5.5 Fermentação 38
3.1.5.6 Remoção do *trub* frio e biomassa cervejeira 40
3.1.5.7 Fermentação secundária e maturação 40
3.1.5.8 Filtração e estabilização coloidal da cerveja 41
3.1.5.9 Carbonatação 41
3.1.5.10 Estabilização microbiológica 41
3.1.5.10 Envase 42
3.2 COMPOSIÇÃO DO MOSTO CERVEJEIRO 43
3.2.1 Compostos nitrogenados no mosto e na cerveja 45
3.3 RESÍDUOS CERVEJEIROS 50
3.3.1 Bagaço de malte 52
3.3.2 *Trub* quente 55
3.3.3 Levedura Residual Cervejeira 57
3.3.4 Terra Diatomácea 60
3.4 ENZIMAS NO PROCESSO CERVEJEIRO 62
3.4.1 Proteases 62
3.5 BACTÉRIAS LÁCTICAS 64
3.6 Planejamento experimental e análise estatística 67
3.6.1 Planejamento de misturas 67
3.6.2 Planejamento fatorial 68
3.6.3 Análise de variância (ANOVA) 69
Capítulo 4 71
Caracterização dos resíduos cervejeiros 71
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 71
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS 72

4.2.1 Resíduos cervejeiros 72
4.2.1.1 Bagaço de malte 72
4.2.1.2 *Trub* quente 74
4.2.1.3 Levedura Residual Cervejeira 75
4.2.2 Caracterização dos resíduos 75
4.2.2.1 Teor de umidade 76
4.2.2.2 Resíduo mineral fixo (cinzas) 77
4.2.2.3 Análises de carbono e nitrogênio total e proteína bruta total 77
4.2.2.4 Análise de carbono e nitrogênio solúvel e proteína bruta solúvel 78
4.2.2.5 Aminoácidos (FAN – *free amino nitrogen*) 78
4.2.2.6 Açúcares redutores 78
4.2.2.7 pH e acidez titulável total 79
4.2.2.8 Demanda química de oxigênio (DQO) 79
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 80
4.3.1 Teor de umidade 80
4.3.2 Resíduo mineral fixo (cinzas) dos resíduos secos 81
4.3.3 Determinação do teor de açúcares redutores solúveis 83
4.3.4 Teor de carbono total dos resíduos secos 84
4.3.5 Teor de nitrogênio total e solúvel e de proteínas brutas 85
4.3.6 Teor de aminoácidos (FAN) da fração solúvel 87
4.3.7 pH e acidez titulável total 88
4.3.8 Demanda química de oxigênio (DQO) 89
4.4 CONCLUSÕES 91
Capítulo 5 92
Seleção de bactérias lácticas com atividade proteolítica 92
5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 92
5.2 MATERIAIS E MÉTODOS 93
5.2.1 Bactérias Lácticas 93
5.2.2 Meios de crescimento e condições de cultivo 93
5.2.3 Desenvolvimento Experimental 96
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 100
5.3.1 Pré-seleção de bactérias lácticas para avaliação da atividade proteolítica 100
5.3.2 Perfis de crescimento e determinação da atividade proteolítica das culturas lácticas pré-selecionadas 102
5.3.3 Curva padrão da absorvância x massa seca 107
5.4 CONCLUSÕES 108
Capítulo 6 109
Comportamento da bactéria láctica nos resíduos cervejeiros 109
6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 109
6.2 MATERIAIS E MÉTODOS 110
6.2.1 Micro-organismo 110
6.2.2 Resíduos cervejeiros 110
6.2.3 Fermentação láctica dos resíduos 110
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 114
6.3.1 Acidez 114
6.3.2 Atividade Proteolítica 131
6.4 CONCLUSÕES 137

Capítulo 7 138
Produção de extrato proteolítico 138
7.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 138
7.2 MATERIAIS E MÉTODOS 139
7.2.1 Micro-organismo 139
7.2.2 Resíduo cervejeiro 139
7.2.3 Desenvolvimento experimental 139
7.2.4 Efeitos de bloco 143
7.2.5 Produtividade da atividade proteolítica 144
7.2.6 Recuperação de proteases 144
7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 145
7.3.1 Fermentação láctica/planejamento fatorial 145
7.3.2 Efeito de bloco 149
7.3.3 Produtividade de atividade proteolítica 150
7.3.4 Purificação e recuperação de proteases 151
7.3.5 Discussão dos resultados 151
7.4 CONCLUSÕES 156
Capítulo 8 157
Produção de mostos cervejeiros 157
8.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 157
8.2 MATERIAIS E MÉTODOS 158
8.2.1 Água 158
8.2.2 Malte 158
8.2.3 Lúpulo 158
8.2.4 Levedura cervejeira 158
8.2.5 Extrato proteolítico 159
8.2.6 Produção de mostos cervejeiros e fermentação 159
8.2.7 Determinações analíticas 164
8.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO 165
8.4 CONCLUSÕES 171
Capítulo 9 172
Conclusões gerais e perspectivas futuras 172
9.1 CONCLUSÕES GERAIS 172
9.2 PERSPECTIVAS FUTURAS 173
Capítulo 10 174
Referências 174
Capítulo 11 197
Apêndice 197
11.1 Curva padrão do método do DNS para determinação do teor de ART 197
Capítulo 12 198
Produção científica 198
12.1 Artigos publicados 198
12.2 Artigos ACEITOS (EM PROCESSO DE REVISÃO) 198
12.3 artigos EM FASE DE ELABORAÇÃO 198

Capítulo 1

Apresentação do Trabalho

1.1 ESTRUTURA DO TRABALHO

O trabalho foi dividido em capítulos de forma a agrupar assuntos correlatos, a fim de facilitar a elucidação e compreensão de todo o conteúdo. Dessa forma, cada capítulo da parte experimental apresenta suas respectivas seções de Objetivos Específicos, Materiais e Métodos, Resultados e Discussão, e Conclusões. Ao final, é apresentado um capítulo de Conclusões Gerais e Perspectivas.

Inicialmente são dispostos os conteúdos teóricos, que vão do Capítulo 1 ao 3. Inicialmente é apresentada a introdução ao tema proposto e a justificativa para a realização do trabalho. Em seguida, é apresentado o objetivo geral proposto em função do material abordado na introdução. Dá-se início, então, à uma breve revisão bibliográfica sobre os principais assuntos estudados nas etapas experimentais, a fim de conferir a fundamentação teórica necessária para discorrer o trabalho, a saber, o processo cervejeiro e seus resíduos, o uso de enzimas e de bactérias lácticas, e o planejamento estatístico de experimentos.

Posteriormente são abordadas as etapas experimentais do trabalho, que compreendem cinco capítulos, numerados de 4 a 8, cujo conteúdo foi agrupado para facilitar a apresentação de metodologias, resultados/discussão e conclusões das diferentes análises e experimentos conduzidos. Primeiramente é feita a caracterização dos três resíduos cervejeiros usados; e em seguida são descritas as etapas de seleção de bactérias lácticas com atividade proteolítica a serem utilizadas como agentes de fermentação. A partir de então, são descritos os experimentos de fermentação láctica dos resíduos cervejeiros. O último capítulo experimental (Capítulo 8) apresenta um exemplo de aplicação do extrato proteolítico, neste caso, o próprio processo cervejeiro.

Os Capítulos 9, 10, 11 e 12 trazem as Conclusões Gerais, a lista de Referências consultadas, os Apêndices, e as publicações referentes ao trabalho, respectivamente.

1.2 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A cerveja é uma bebida alcoólica milenar que permite ao consumidor degustar diferentes tipos e estilos, a depender da forma como é conduzido seu processo de produção e/ou das matérias-primas que são utilizadas para sua obtenção. De maneira geral, a cerveja é o produto resultante da fermentação, por ação de leveduras cervejeiras, de mosto obtido a partir de cereal malteado (cevada), acrescido ou não de outros cereais ou fontes de açúcares (denominados adjuntos), com adição de lúpulo (TSCHOPE, 2001; REHM e REED, 1983; PRESCOTT e DUNN, 1949).

Por muitos séculos a produção de cerveja em escala artesanal era suficiente para suprir toda a demanda, produzindo-se cervejas de grande variedade de estilos. Contudo, a grande difusão e aceitação desta bebida ao longo de sua história levou a cerveja a ser uma das bebidas mais apreciadas e consumidas nos cinco continentes, em países de diferentes climas e culturas. Dessa maneira, com o advento da Revolução Industrial, teve início a sua produção em grandes escalas, fator que caracteriza o mercado cervejeiro até os dias atuais, devido ao desenvolvimento de tecnologias modernas e à necessidade de atender com rapidez à demanda do crescente mercado consumidor.

Outra característica do mercado cervejeiro atual é a existência de grandes marcas que dominam o maior percentual de produção e vendas da bebida, que, na maioria dos casos, se originaram de fusões ou aquisições entre empresas que despontavam no mercado. Atualmente, as três maiores cervejarias do mundo são a AB InBev (US$ 31,7 bi em vendas), a SABMiller (US$ 18,2 bi), e a Heineken (US$ 16,15 bi). O Brasil, que representa o maior percentual de ações da AB InBev, ocupa a 3ª posição no *ranking* mundial de produção (12,4 bi L/ano) e o 15º lugar em relação ao consumo, superior a 60 litros *per capita* ao ano (Portal Cervesia, 2011).

Devido à grande disputa pelo mercado com preços competitivos e pela necessidade de suprir à demanda com agilidade, diversas medidas podem ser tomadas, visando reduções dos custos de processo ou dos tempos de produção e são comumente aplicadas pelas grandes indústrias. Como exemplo, podem ser citadas: a introdução de adjuntos ao processo, como fontes de carboidratos que substituem parcialmente o malte de cevada (que possui maior custo e menor rendimento total); a supressão do pousio de atividade

proteolítica durante a etapa de preparo do mosto (mostura); e a redução dos tempos de maturação da bebida, após a fermentação.

Contudo, tais medidas podem comprometer a qualidade sensorial e nutricional da bebida produzida, inclusive podendo acarretar problemas durante todo o seu pós-processamento, devido à sua forte relação com a composição proteica do mosto cervejeiro. O teor de fontes de nitrogênio (destacando-se as proteínas) presente depende exclusivamente da matéria-prima e/ou adjunto utilizados, e da razão cereal:água que compõe o meio. Porém, o perfil dos compostos nitrogenados no mosto cervejeiro (elevada, média e baixa massa molar) não depende exclusivamente das matérias-primas empregadas no preparo do mosto, mas, depende também, da condução de cada etapa do processo, das quais se pode destacar a mostura.

A mostura é a etapa do processo que se destina à quebra (hidrólise) do amido (material de reserva energética dos vegetais), e de outras macromoléculas, em açúcares simples (glicose e maltose) e outros nutrientes assimiláveis pela levedura cervejeira, devido à ação de enzimas inerentes ao cereal malteado. Tradicionalmente, a mostura é realizada em rampas de aquecimento, com períodos de pousio, de forma a estabelecer as temperaturas adequadas para atividade de diferentes grupos enzimáticos, dentre os quais as enzimas proteolíticas e, sobretudo, as amilolíticas (KUNZE, 1999; HOUGH, 1990). Diversos problemas podem decorrer de uma mostura mal conduzida ou caso o pousio proteolítico seja suprimido com finalidade de economia de energia e tempo, procedimento comum em grandes indústrias.

Esta forma de condução pode acarretar insuficiência nutricional para a levedura, que é dependente de aminoácidos que seriam liberados nesta etapa, e que, por sua vez, pode resultar na biossíntese de subprodutos indesejáveis, como as diacetonas vicinais, estritamente relacionados ao perfil proteico do mosto. Uma vez presentes no meio, as diacetonas vicinais são absorvidas e reduzidas pela levedura cervejeira para reoxidação de fatores do metabolismo, contudo, este processo requer leveduras com elevada vitalidade e longos tempos de maturação. Ademais, sem a hidrólise ideal, haverá maior concentração de proteínas de elevada massa molar, que tendem a se complexar, prejudicando a estabilidade coloidal da bebida mesmo depois de filtrada, até durante o tempo de prateleira, o que, em

geral, exige o acréscimo de uma etapa de estabilização para remoção destes compostos por adsorção em materiais específicos, como a sílica, por exemplo.

A omissão do pousio proteolítico pode ocasionar, ainda, outro problema, que surge na etapa de cocção do mosto, devido à maior quantidade de *trub* quente formado. O *trub* quente é um resíduo gerado, principalmente, pela complexação de proteínas de elevada massa molar, uma vez que estas não serão eficientemente hidrolisadas durante a mostura e passam por processo de desnaturação e coagulação em temperaturas elevadas. Se o *trub* for carreado para a etapa posterior, de fermentação, poderá causar inibição da levedura cervejeira, e também causar sabores e aromas desagradáveis no produto final, interferindo no pós-processamento e durante a conservação da cerveja. Logo, deve ser retirado do mosto antes da inoculação, tornando-se, então, um resíduo sólido do processo cervejeiro. Estima-se que sejam gerados entre 0,2 e 0,4 kg de *trub* quente para cada hectolitro de cerveja produzida (BRIGGS et al, 2004).

Outra característica do processo cervejeiro é a geração de três resíduos intrínsecos, ditos inevitáveis, e de um quarto resíduo que depende do tipo de cerveja produzida. A saber, o bagaço de malte, o *trub* quente, a levedura residual cervejeira e a terra diatomácea; todos com elevada carga orgânica e ricos em compostos nitrogenados, como proteínas e peptídeos.

O bagaço de malte (BM) é o primeiro resíduo sólido a surgir ao longo do processo[1], após a etapa de mostura, quando já foram extraídos todos os compostos solúveis de interesse dos grãos do cereal malteado, que são esgotados por lavagem com água. Constitui o resíduo sólido de maior quantidade, sendo gerados entre 14 e 20 kg para cada hectolitro de cerveja produzida (LIMA, 2010). Sua composição depende significativamente dos processos de moagem e mostura aos quais é submetido.

A levedura cervejeira pode ser reutilizada para inocular novos tanques de fermentação, uma vez que se reproduzem intensamente, principalmente nas horas iniciais da etapa de fermentação, aumentando sua população entre 3 e 4 vezes dentro do reator (YAMADA et al, 2003). Contudo, esta reutilização tem limite, o qual leva em consideração a contaminação do inóculo, bem como a viabilidade e a vitalidade celular. Portanto, de tempos em tempos, a indústria cervejeira deve dar destino adequado à grande quantidade de material, agora

[1] Levando-se em consideração o modelo atual de cervejarias que não contemplam a etapa de malteação em seu processo produtivo, adquirindo malte pronto para utilização.

denominado por Levedura Residual Cervejeira (LRC), gerado entre 1,5 e 3 kg por hectolitro de cerveja produzida (OLAJIRE, 2012; FERREIRA et al, 2010).

A terra diatomácea é utilizada na filtração da bebida final, na qual ocorre a retenção de material sólido, principalmente leveduras e complexos de proteínas e polifenóis. Para cervejarias de grande porte e em países em que se tem por hábito o consumo de cervejas límpidas, este auxiliar filtrante é o mais utilizado e pode ser gerado como resíduo úmido (cerca de 70% de umidade), na proporção entre 0,3 e 0,6 kg para cada 100 L de cerveja produzida (FILLAUDEAU, BLANPAIN-AVET e DAUFIN, 2006).

O crescente consumo de cerveja em todo mundo implica maior geração destes resíduos, cujo descarte no ambiente impõe tratamentos onerosos devido à elevada carga orgânica e à intensa quantidade diariamente produzida. Considerando a produção anual de cerveja no Brasil de 12,4 bilhões de litros (CERVESIA, 2011), a Figura 1.1 apresenta as quantidades médias destes resíduos gerados anualmente.

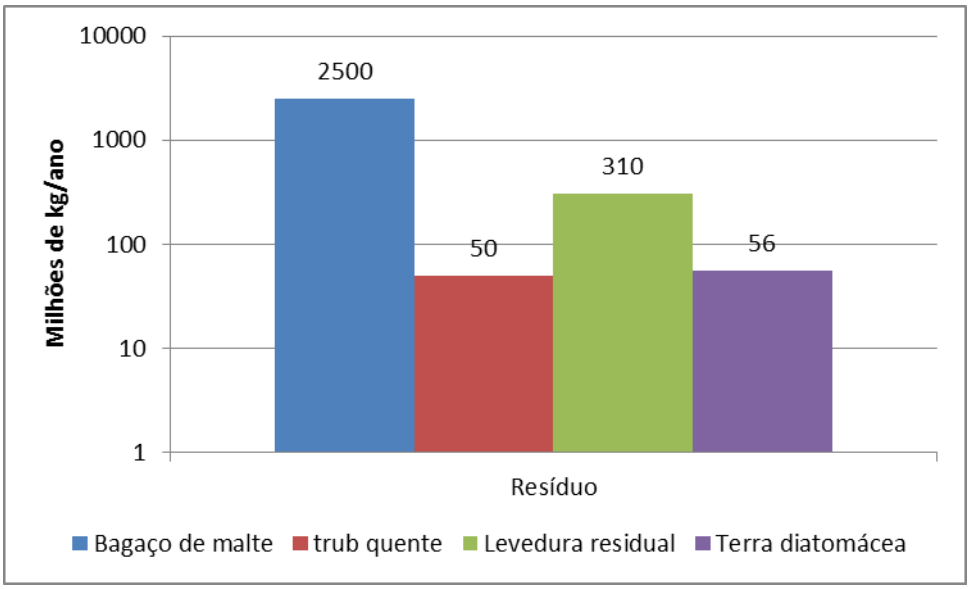

Figura 1.1: Quantidades de resíduos gerados pela indústria cervejeira no Brasil (em massa úmida) (Elaborado a partir de dados de OLAJIRE, 2012; CERVESIA, 2011; FERREIRA et al, 2010; LIMA, 2010; FILLAUDEAU, BLANPAIN-AVET e DAUFIN, 2006; BRIGGS et al, 2004).

Estes resíduos apresentam rica composição química (Tabela 1.1) e nutricional, e, portanto, exigem elevada demanda bioquímica de oxigênio para degradação. Desta maneira, sua disposição no ambiente gera uma série de transtornos ao ecossistema e os resíduos devem ser, então, tratados antes de sua disposição final, o que muitas vezes representa custos que são incluídos na cadeia produtiva para repasse ao consumidor. Nesse aspecto,

visando à obtenção de produtos de maior valor agregado e a destinação dos resíduos gerados para fins mais nobres, os bioprocessos industriais apresentam-se como potenciais meios para destinação destes rejeitos (ALIYU; BALA, 2011; YAMADA et al, 2003; PANDEY et al, 2000), com destaque para o bagaço de malte, o *trub* quente e a levedura residual cervejeira.

Quadro 1.1: Principais componentes presentes nos resíduos cervejeiros *

	Bagaço de malte	*trub* quente	Levedura residual	Terra diatomácea
Fibras	√	-	-	-
Carboidratos	-	√	√	-
Proteínas	√	√	√	√
Aminoácidos	√	-	√	-
Cinzas	√	√	√	-
Vitaminas	√	-	√	-
Compostos fenólicos	√	√	-	√
Ácidos graxos	-	√	√	-
Materiais fósseis	-	-	-	√

*Quadro elaborado a partir de diversos dados da literatura, especificados na seção 3.3 do trabalho.

Em face de suas composições químicas ricas em proteínas (BM, 15-25%; *trub* quente, 50-70%; LRC, 35-60% - em base seca), torna-se muito conveniente a sua utilização para a formulação de meios indutivos para fermentação e obtenção de enzimas proteolíticas extracelulares. Depois de extraídos do meio, tais complexos enzimáticos podem apresentar diferentes aplicações em bioprocessos. Porém, seria de grande interesse o emprego destes resíduos para a sustentabilidade do próprio processo cervejeiro. Uma estratégia seria direcionar os resíduos para a geração de bioprodutos capazes de incrementar ou acelerar a produção da cerveja, ou ainda, melhorar sua qualidade química, físico-química e sensorial.

Tendo-se ciência dos problemas gerados devido à supressão do degrau proteolítico durante o preparo do mosto, pode haver necessidade de se empregar enzimas proteolíticas exógenas nas etapas de mostura e/ou de acabamento da cerveja. Contudo, as enzimas comerciais apresentam custos consideráveis e sua obtenção por via microbiana (geralmente a partir do cultivo de fungos filamentosos), em geral, é dificultada e demorada. Portanto, fica evidente a necessidade de serem avaliadas novas matérias-primas de baixo custo, bem como de micro-organismos potenciais produtores destes complexos enzimáticos.

Devido aos longos tempos de fermentação envolvidos nos processos com fungos filamentosos (grandes produtores de proteases), outros micro-organismos que podem se apresentar como potencial para aplicação na obtenção de extratos enzimáticos são as bactérias lácticas. Este grupo microbiano apresenta significativa atividade proteolítica, necessária para a obtenção de aminoácidos essenciais ao seu desenvolvimento (PANESAR, et al, 2007).

Além disto, a atuação destes micro-organismos e enzimas tende a alterar o perfil de massa molar dos compostos nitrogenados presentes. Dessa maneira, podem-se extrair para a fração solúvel proteínas de baixa massa molar, peptídeos e aminoácidos, antes insolúveis ou de elevada massa molar, gerando um extrato passível de aplicação para enriquecimento do mosto, fornecendo fontes nitrogenadas na quantidade e tamanho molecular adequados para a atividade metabólica da levedura cervejeira, com grande impacto sobre a geração de subprodutos da fermentação, como o diacetil, por exemplo.

Na literatura, há relatos sobre a avaliação da atividade proteolítica de bactérias lácticas (TAKAFUJI et al, 1995; KOK e VENEMA, 1988), contudo, poucos trabalhos objetivam a fermentação láctica de materiais para obtenção de extrato proteolítico ou para aumento da fração de nitrogênio solúvel no meio, devido à atividade destes micro-organismos. Nenhum trabalho encontrado utiliza bactérias lácticas e resíduos cervejeiros para estas finalidades.

Pode-se inferir, portanto, que este trabalho é inovador, já que pretende desenvolver tecnologia para atender às demandas do crescente mercado cervejeiro que leva os produtores a reduzir o tempo de produção e fornecer cervejas de preço final mais acessível ao consumidor, contudo, sem alterar a qualidade da bebida. E, ainda, visando à consolidação de um processo mais limpo em aspectos ambientais, com reduzida geração de resíduos.

Capítulo 2

Objetivo Geral

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral do presente trabalho foi o aproveitamento de três resíduos sólidos, de elevada carga orgânica, gerados pelo processo cervejeiro, a saber, o bagaço de malte, o *trub* quente e a levedura residual cervejeira, visando à produção de extrato rico em atividade proteolítica a partir da fermentação láctica destes resíduos.

Para tanto, foram estabelecidas as seguintes etapas experimentais:

- Caracterizar os resíduos cervejeiros;
- Selecionar cultura de bactéria láctica com elevada atividade proteolítica;
- Avaliar o comportamento da cultura láctica sob cultivo em meios formulados a partir dos resíduos cervejeiros;
- Otimizar a produção de proteases por fermentação láctica;
- Avaliar a aplicação do extrato proteolítico obtido para a produção de mostos cervejeiros.

O trabalho foi dividido em cinco etapas experimentais, já descritas no Item 1.1 (Estrutura do trabalho), cujos objetivos específicos são contemplados em cada capítulo subsequente.

Capítulo 3

Revisão Bibliográfica

O presente capítulo apresenta os principais assuntos relacionados ao trabalho experimental proposto. Para facilitar a compreensão, o texto foi dividido em seis seções distintas, agrupando os temas afins.

Na primeira seção é apresentada uma breve revisão sobre a cerveja, incluindo a definição da bebida, seguida de um breve histórico e uma rápida abordagem da conjuntura de seu mercado atual. Nas subseções seguintes, são abordados os assuntos mais relevantes do processo cervejeiro, com descrição das principais matérias-primas envolvidas, das etapas de preparo do mosto, do bioagente utilizado na fermentação, e das etapas de processamento pós-fermentação.

Na segunda seção é estudada a composição do mosto cervejeiro e da cerveja, com ênfase nos compostos nitrogenados presentes, como resultado de características das matérias-primas e do processo de produção. São também abordados os efeitos desta composição sobre a qualidade da bebida.

A terceira seção apresenta os quatro resíduos sólidos do processo cervejeiro, abordando suas características e composição, bem como a fase do processo e a proporção em que são gerados. Também são apresentadas as atuais utilizações dos mesmos, bem como o potencial para novas aplicações.

Na quarta seção são explicitados os papeis das enzimas atuantes no mosto cervejeiro, com ênfase para as enzimas proteolíticas.

A quinta seção apresenta uma breve revisão da utilização industrial de bactérias lácticas, das características destes micro-organismos, bem como são evidenciados trabalhos de avaliação da atividade proteolítica para tratamento de matérias ricas em compostos nitrogenados de elevada massa molar.

Por fim, na sexta seção, são revisados os planejamentos experimentais e testes estatísticos utilizados para desenvolvimento dos experimentos e análise dos resultados.

3.1 CERVEJA

3.1.1 Definição

De maneira geral, pode-se definir a cerveja como a bebida alcoólica carbonatada, obtida a partir da fermentação alcoólica de mosto cervejeiro contendo malte de cevada, água potável e lúpulo, por ação de leveduras. Tem-se ainda que o malte pode ser substituído por seus extratos ou parcialmente substituído por outros cereais, maltados ou não, denominados adjuntos, cuja variação na composição ou processo gera os diferentes tipos da bebida (TSCHOPE, 2001; REHM e REED, 1983).

No Brasil, a produção da bebida é regulamentada pela Lei n° 8.918, de 14 de julho de 1994, regulamentada pelo decreto n° 6.871, de 4 de junho de 2009, que a define como a bebida obtida pela fermentação alcoólica do mosto cervejeiro contendo água potável, malte de cevada e lúpulo, por ação de levedura cervejeira. O mosto pode ainda ser adicionado de outros cereais, germinados ou não, ou de extratos açucarados, que substituem parcialmente o malte de cevada (BRASIL, 2009).

A cerveja pode receber diferentes classificações em virtude de alterações das matérias-primas ou de seu processo de produção, sendo impossível definir com precisão quantos tipos desta bebida existem em todo o mundo. Pequenas mudanças no processo de fabricação, como diferentes tempos e temperaturas de mostura, fermentação e maturação, e o uso de outros ingredientes que não somente os quatro básicos - água, lúpulo, cevada e malte - geram uma grande variedade de cervejas com características diferenciadas.

3.1.2 Histórico e Mercado

Há registros de que a cerveja é uma das bebidas fermentadas mais antigas da história. Os primeiros relatos remontam sua produção há mais de 5 mil anos, na Mesopotâmia e no Egito, civilizações que se destacavam na produção de cereais, sendo cerveja e pão distribuídos como alimento diário aos trabalhadores (KUNZE, 1999).

Quando difundida pela Europa, destacaram-se em sua produção, inicialmente, Grécia e Roma, até então apenas consumidores de vinho. Contudo, mais tarde, durante o Império Romano, o povo de origem germânica se sobressaiu na arte de produção de cerveja, muito vinculada à religião, sendo fabricada principalmente em monastérios, que são os locais de

origem das cervejarias mais antigas da história (BAMFORTH, 2003; BOULTON e QUAIN, 2001). Após a revolução industrial, Inglaterra e Alemanha tornaram-se grandes produtores da bebida (LIMA et al, 2001b) e assim permaneceram por longos períodos. Atualmente, a China é a maior produtora de cerveja, produzindo cerca de 48,9 bilhões de litros por ano, seguida dos Estados Unidos (22,5 bilhões de litros anuais) e do Brasil (12,4 bilhões).

Apesar de ser o terceiro maior produtor da bebida, a chegada da cerveja no Brasil foi tardia. O clima impróprio para cultivo da cevada e do lúpulo, bem como o hábito do consumo de vinho por portugueses foram fatores que contribuíram para o não desenvolvimento desta cultura no país. A história indica a Bohemia como a primeira cervejaria do Brasil, fundada em 1853, na cidade de Petrópolis, no Rio de Janeiro. Contudo, a produção industrial se estabeleceu com a criação da Manufactura de Cerveja Brahma Villiger & Companhia, em 1888, também no Rio de Janeiro, seguida da criação da Companhia Antarctica Paulista, em São Paulo, em 1891 (AQUARONE et al, 2001).

O mercado cervejeiro mundial é caracterizado por grandes empresas do ramo, que surgiram principalmente de grandes fusões e aquisições. Neste aspecto, o Brasil apresentou importante papel. No ano 2000, Brahma e Antárctica, que possuíam o maior percentual do mercado brasileiro, passaram por processo de fusão, tornando-se a AmBev (CAMARGOS e BARBOSA, 2005). Em 2004, nova grande fusão ocorreu, entre a AmBev e a Interbrew, de origem belga, que resultou na criação da InBev, que disputava o primeiro lugar com as americanas SABMiller e Anheuser-Busch. Recentemente, a aquisição de uma das maiores concorrentes mundiais, a Anheuser-Busch, produtora da Budweiser, transformou a InBev em AB-InBev, a maior companhia de bebidas do mundo. Outras aquisições também ocorreram, como a aquisição do Grupo BBH pela Heineken-Carlsberg e a formação da MillerCoors, pela SABMiller e Molson Coors através de uma *joint venture*. Dessa forma, os cinco maiores grupos cervejeiros, AB Inbev, SAB Miller, Heineken, Carlsberg e a China Resource Brewery Ltd., representam agora quase 50% do mercado cervejeiro mundial (CERVESIA, 2008).

3.1.3 Matérias-primas cervejeiras

Três matérias-primas principais são requeridas para o preparo do mosto utilizado na produção de cerveja: água, malte de cevada e lúpulo, cuja qualidade tem influência decisiva nas propriedades e consequente aceitação do produto final. Para fins da melhor exposição

didática possível, será considerada como matéria-prima a cevada e o malte será abordado na etapa de malteação, no processo.

A água a ser utilizada no processo – denominada água cervejeira – deve cumprir requisitos que vão além de sua potabilidade, uma vez que a composição desta pode influenciar consideravelmente o processo e o produto final, principalmente a atividade enzimática, o brilho, a espuma, o aroma e o sabor da bebida. Deve, portanto, ser isenta de cor, turbidez, sabor, odor e, ainda, deve apresentar baixa carga microbiana e baixo teor de gases dissolvidos (DRAGONE e SILVA, 2010).

Diversos cereais, de composição predominantemente amilácea, podem ser utilizados para produção de cerveja. Contudo, a cevada é o preferencial e até mesmo dito insubstituível (LEWIS e YOUNG, 2001), o que acarreta grande consumo deste pela indústria cervejeira. No ano 2000, cerca de 94% da produção mundial de cevada (em torno de 10^7 toneladas) foi destinada à produção da bebida (MORRIS e BRYCE, 2000). A composição da cevada depende de diversos fatores, como variedade, solo, clima e época de cultivo. Dentre seus principais constituintes, destacam-se: polissacarídeos amiláceos e não-amiláceos (celulose e hemicelulose, incluindo β-glucanas e pentosanas), proteínas, lipídeos e outros em menores quantidades, como monofenóis, polifenóis e alguns íons (HORNSEY, 1999). A Tabela 3.1 apresenta a composição da cevada.

Tabela 3.1: Composição química da cevada

Componente	%
Amido	50-63
Proteína	8-16
Hemicelulose	10
Celulose	5-6
Lipídeos	1,5-2,0
Minerais e inorgânicos	2,0-4,0

Fonte: KUNZE, 1999.

O lúpulo (*Humulus lupulus*) é uma planta trepadeira perene, de crescimento rápido, que dispõe suas flores masculinas e femininas em diferentes organismos. De clima frio e difícil cultivo, é sujeita à pragas e doenças e necessita de regas frequentes, luz intensa, pouco vento e solo profundo e pouco compactado para crescimento de suas longas raízes (KUNZE, 1999). Em geral, as inflorescências femininas não fecundadas são utilizadas como matéria-

prima cervejeira, pois contêm a lupulina intacta, que é um conjunto de glândulas de cor amarela, onde se concentram resinas amargas, óleos essenciais e polifenóis (DRAGONE e SILVA, 2010; KUNZE, 1999). Com a inclusão dos minerais, estas substâncias presentes no lúpulo são as de maior importância e influência no processo cervejeiro.

Os adjuntos são definidos como materiais capazes de fornecer carboidratos ao mosto cervejeiro, para complementação do teor obtido através do processamento da matéria-prima principal, o malte de cevada (BRIGGS et al, 2004). Sua utilização é muito comum em diversos países, a depender da legislação vigente promovendo consideráveis reduções no custo do processo (TSCHOPE, 2001; HORNSEY, 1999). Os adjuntos normalmente usados são: amiláceos (gritz de milho, quirera de arroz, trigo, cevada, sorgo, aveia, centeio), produzindo dextrinas e açúcares fermentescíveis no meio; açúcares (xarope de milho *high maltose*, açúcar cristal, açúcar invertido), incorporando basicamente açúcares de fermentação; e extratos (extrato de malte, extrato de cevada) (LIMA et al, 2001b; KUNZE, 1999).

Aditivos ou coadjuvantes são substâncias adicionadas em pequenas quantidades e que possuem efeito benéfico sobre o produto ou sobre o processo, respectivamente. Exemplos são: enzimas, agentes filtrantes, agentes clarificantes, conservantes, antioxidantes, acidulantes, agentes tamponantes, estabilizantes coloidais, e aditivos de cor ou sabor. Devido à suas aplicações de papel muito específico, estes componentes serão abordados juntamente às etapas do processo em que são aplicados.

3.1.4 Agentes de fermentação

Diversos micro-organismos são capazes de produzir etanol a partir de carboidratos, através de seu metabolismo energético. O destaque é dado para leveduras, cujo gênero *Saccharomyces* tem grande utilização na área de alimentos e bebidas. As leveduras cervejeiras são micro-organismos aeróbios facultativos, que na presença de oxigênio realizam respiração aeróbia, e, na ausência, o metabolismo fermentativo. São capazes de metabolizar açúcares simples liberando rapidamente importantes metabólitos no meio, o etanol e o CO_2 (TORTORA, CASE E FUNKE, 2011; BOULTON e QUAIN, 2001; PRESCOTT e DUNN, 1949). Dentre as espécies do gênero citado, *S. cerevisiae* e *S. uvarum* são as chamadas leveduras cervejeiras. A última era denominada por *S. carlsbergensis* (BAMFORTH, 2003).

As leveduras da espécie *S. cerevisiae*, associadas à cerveja do tipo *Ale*, apresentam melhor atividade em temperaturas entre 18 e 22 °C. Estas são chamadas leveduras de alta fermentação (ou de topo), uma vez que tendem a formar agregados, chamados pseudo-hifas, que sofrem flotação por arraste com CO_2, durante a fermentação tumultuosa (DRAGONE e SILVA, 2010; BAMFORTH, 2003; BOULTON e QUAIN, 2001). Já as leveduras da espécie *S. uvarum* têm ótimo metabólico entre 6 e 15 °C e tendem a sofrer floculação, principalmente quando a fonte de açúcar fermentescível se extingue, podendo ser resultado de uma condição de estresse para o micro-organismo. Dessa maneira, os flocos pesados se depositam ao fundo do reator, e, por isso, estas são denominadas leveduras de baixa fermentação (ou de fundo), associadas à produção de cerveja tipo *Lager* (DRAGONE e SILVA, 2010; BAMFORTH, 2003; BOULTON e QUAIN, 2001).

O inóculo, como é chamado, pode provir de fermento que está sendo utilizado pela primeira vez, e recebe o nome de fermento zero (ou fermento R, de raiz). Contudo, prática comum na indústria cervejeira é a reutilização de células, uma vez que se multiplicam em torno de três a quatro vezes no reator de fermentação, sendo capaz de inocular outros reatores posteriores (VIEIRA et al, 2013b; KNUDSEN, 1978).

3.1.5 Processo Cervejeiro

A qualidade da cerveja produzida é totalmente dependente da forma de condução do processo de produção e de seu respectivo controle. Deve ser minimizado o surgimento de problemas que gerem alterações de características físicas, químicas, microbiológicas e sensoriais, desde a escolha e tratamento das matérias-primas, seu processamento, fermentação, e etapas seguintes de finalização do produto, inclusive durante o seu transporte e estocagem.

A Figura 3.1 apresenta o diagrama de blocos do processo cervejeiro, cujas etapas serão resumidamente descritas a seguir.

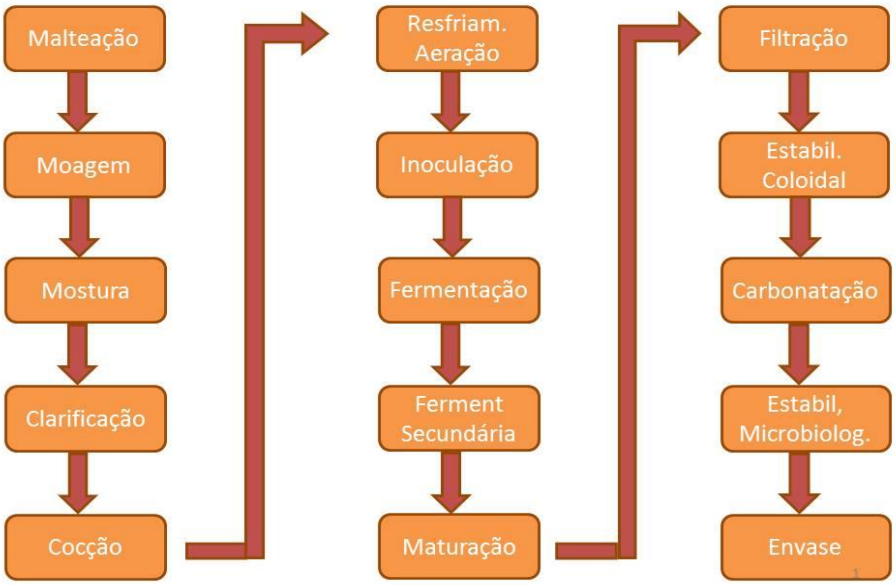

Figura 3.1: Diagrama de blocos do processo cervejeiro
(Elaborado a partir de diversos dados da literatura, especificados ao longo do texto).

3.1.5.1 Malteação

Devido à incapacidade da levedura cervejeira de produção de enzimas extracelulares para metabolizar o amido disponibilizado pela cevada e/ou adjunto, é necessária uma etapa prévia denominada malteação (ou maltagem), que tem por objetivo principal promover o aumento do conteúdo enzimático do cereal e de seu chamado poder diastático[2] (O'ROURKE, 2002). Esta propriedade permitirá que o amido e demais macromoléculas sejam hidrolisados para disponibilização de açúcares fermentescíveis e de outros compostos de importância, durante a etapa seguinte, de brassagem (LIMA et al, 2001b). A malteação é dividida em três subetapas, a saber: a maceração (hidratação), a germinação e a secagem. Por ser um processo longo e que exige rigorosos monitoramento e controle, muitas indústrias optam por não realizar a malteação em suas cadeias produtivas, adquirindo o malte seco de empresas denominadas maltarias ou maltearias.

[1] Poder diastático representa a atividade enzimática do malte em função da quantidade de sacarídeos (ou dissacarídeos) ou aminoácidos (em gramas) formados a partir da atuação enzimática em 100 g de malte. É expressa em °Lintner (°L) ou em °Windiscj-Kolbach (°WK) (Fonte: Jornal da Cerveja, 2013).

3.1.5.2 Moagem

A etapa de moagem do malte consiste na quebra e esmagamento do grão, reduzindo-o de maneira uniforme, objetivando o aumento da superfície de contato do grão, a exposição da fração amilácea para ação enzimática, a quebra longitudinal da casca, mantendo-a com máxima conservação possível, uma vez que será fundamental na etapa de clarificação do mosto que será vista adiante (LIMA et al, 2001b; KUNZE, 1999). A forma de condução desta etapa apresenta importante influência na composição do mosto cervejeiro, já que o tamanho e qualidade das partículas obtidas estão diretamente relacionados à taxa de transformações químicas e bioquímicas durante a mostura, ao rendimento da brassagem, à clarificação do mosto, à textura e à estabilidade coloidal do produto final (DRAGONE e SILVA, 2010).

3.1.5.3 Brassagem

A brassagem é a etapa do processamento cervejeiro que tem por objetivo o preparo do mosto, e compreende três subetapas, a mostura, a clarificação e a cocção (ou fervura). Alguns autores, como Kunze (1999) e Bamforth (2003), acrescentam a moagem a este conjunto de operações. Cada procedimento será detalhado a seguir.

Mostura

O malte e os possíveis adjuntos utilizados devem ser adicionados de água, para que ocorra solubilização dos compostos presentes. Contudo, desta mistura, apenas uma pequena parte de sua composição é diretamente solúvel em água, em torno de 10 a 15%, que inclui pequenas quantidades de açúcares fermentescíveis, dextrinas, substâncias inorgânicas e algumas proteínas. As substâncias insolúveis, que compreendem o restante do material, podem ser celulose, amido e proteínas de elevada massa molar.

Portanto, para que se promova a extração de todos os componentes de interesse na matéria prima, deve ser realizada a mostura, ou mosturação, que é principal processo durante a etapa de obtenção de mosto cervejeiro rico em substratos fermentescíveis e com fontes de nitrogênio em tamanho molecular adequados. A mostura consiste na produção do

extrato, cujo nome provém da extração de substâncias do malte e adjuntos, devido à hidrólise de materiais poliméricos presentes nestas matérias-primas e sua transferência para a fração aquosa. O extrato é parcialmente caracterizado pelo teor de sólidos solúveis presentes, avaliado a partir da densidade da solução e expressa, geralmente, em °Plato (% m/m de sólidos solúveis na solução) (MANNING, 1993). Quanto maior o valor de extrato obtido, maior o rendimento do processo e menor o custo (KUNZE, 1999).

Resumidamente, o que ocorre é a atuação de amilases, proteases, fosfatases e glucanases, que promovem a hidrólise de macromoléculas permitindo maior solubilização de material no meio aquoso (LIMA et al, 2001b). Cerca de 70 a 80% da massa dos grãos é dissolvida durante o processo de mostura e extraída na etapa seguinte, de clarificação do mosto. O processo se dá pela aplicação de calor de modo a atingir diferentes temperaturas delineando-se as curvas de mostura, nas quais há períodos de pousio específicos para atuação de diferentes enzimas.

Esta etapa é necessária uma vez que os micro-organismos da fermentação, neste caso, as leveduras cervejeiras, necessitam de açúcares fermentescíveis para obtenção de energia e liberação de etanol e CO_2, bem como de nitrogênio livre (FAN – *free amino nitrogen*) na forma de aminoácidos e peptídeos para formação de constituintes celulares essenciais (BAMFORTH, 2003).

Indiretamente, a mostura tem o poder de definir o perfil da cerveja produzida, pois influencia diversas características, como: o sabor (produtos e subprodutos da fermentação, e permanência de substâncias insolúveis não hidrolisadas); a cor (principalmente pela liberação de nitrogênio solúvel e açúcares redutores que sofrerão posteriores reações paralelas); a textura (pela presença de proteínas e dextrinas); a estabilidade da espuma e a turvação da cerveja (influenciadas, também, pelo perfil proteico); o poder calórico; o teor de álcool; e a carbonatação (BRIGGS et al, 2004).

Clarificação

Após a etapa de mostura, cerca de 70 a 80% da massa dos grãos é solubilizada pela ação das enzimas e deve ser separada da parte sólida residual por processo de clarificação (ou filtração). A mistura, ainda em temperatura elevada (76-80 °C) é disposta em equipamentos específicos (tinas de clarificação com fundo falso, ou filtros prensa), para que os sólidos

(principalmente bagaço de malte) sejam retidos e o fluxo do líquido seja permitido. Este deverá ser recirculado por sobre a camada sólida até que se forme uma torta de filtração eficiente na retenção de todo material insolúvel (que inclui proteínas coaguladas) com liberação de mosto límpido e brilhante (BRIGGS et al, 2004). A fração solúvel, ou extrato, agora é denominada mosto primário ou doce, devido à sua composição predominantemente rica em açúcares de fermentação (maltose, maltotriose e glicose), que constituem cerca de 65% dos açúcares do mosto extraído (KUNZE, 1999).

De forma a aumentar a extração de compostos solúveis retidos na camada filtrante, elevando-se o rendimento da mostura, nova quantidade de água, chamada água secundária, pode ser utilizada para lavagem do material sólido. Em geral, água à 78 °C, na mesma quantidade que a água primária (utilizada no processo de mostura), deve ser passada pela fração solida ainda antes que escoe totalmente o mosto, para evitar a oxidação de compostos retidos na parte superior da torta filtrante.

Cocção

Após a clarificação, o mosto é transferido para caldeiras e aplica-se calor até que seja atingida a temperatura de cocção (ou fervura. Este processo pode durar entre 30 e 120 minutos, nos quais pode ser distribuída a adição de adjuntos açucarados e lúpulo (PRIEST e STEWART, 2006). Os principais objetivos desta etapa são: destruição das enzimas; aumento da estabilidade coloidal; desinfecção; eliminação de compostos voláteis indesejáveis; precipitação de fosfato de cálcio com redução do pH; desenvolvimento de cor; formação de compostos de aroma e sabor; concentração do mosto e ajuste do extrato inicial (BRIGGS et al, 2004; BAMFORTH, 2003; KUNZE, 1999). A elevada temperatura de fervura também tem importante efeito sobre a lupulagem do mosto, que promove a isomerização e solubilização de seus compostos no mosto cervejeiro (HORNSEY, 1999; HAUNOLD e NICKERSON, 1993).

Durante a cocção do mosto é formado o *trub* quente, que deve ser removido do meio. Os detalhes sobre a formação deste resíduo, sua composição e remoção do meio serão abordados no Item 3.3.2.

Considera-se, neste estágio, encerrada a etapa de preparo do mosto ou brasagem, e devem ser avaliados alguns parâmetros, como: limpidez, volume e extrato alcançados; bem

como podem ser calculados o rendimento e a eficiência da brassagem (KUNZE, 1999). Diz ter sido obtido o mosto de apronte.

3.1.5.4 Resfriamento e aeração

O mosto de apronte é, então, submetido ao resfriamento para a temperatura de fermentação, que depende do tipo de cerveja a ser produzido. Apenas após a redução da temperatura, o mosto deve ser aerado, para que seja disponibilizado oxigênio com saturação entre 6 e 9 mg/L, essencial para o desenvolvimento da levedura cervejeira nas fases iniciais da fermentação, uma vez que seu metabolismo aeróbio apresenta maior rendimento energético (PRIEST e STEWART, 2006; BRIGGS et al, 2004).

3.1.5.5 Fermentação

O inóculo é responsável pela fermentação, etapa indispensável para a produção da cerveja (DRAGONE e SILVA, 2010). Consiste na atuação metabólica da levedura cervejeira para transformação de açúcares em biomassa, etanol e subprodutos e, consequentemente, do mosto em cerveja, em um processo que dura entre 5 e 7 dias. Este processo é complexo e ainda apresenta aspectos que necessitam ser elucidados (BOULTON e QUAIN, 2001), sendo objeto de estudo de diversas pesquisas.

As leveduras cervejeiras, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces uvarum*, são organismos heterotróficos, que, portanto, necessitam de um substrato orgânico que atua como fonte de carbono e energia. São seres facultativos, de forma que podem realizar a respiração aeróbia (ciclo de *Krebs*) ou a fermentação (alcoólica) como vias metabólicas, na presença ou ausência de oxigênio livre, respectivamente (LIMA et al, 2001b). A primeira etapa do metabolismo é comum para os dois caminhos metabólicos. A via glicolítica (glicólise, ou ainda, via de Embden-Meyerhof), na qual o açúcar redutor (glicose, frutose, maltose e maltotriose, nesta ordem) sofre um processo de oxidação em uma sequência de dez reações bioquímicas para geração de energia e acúmulo de um composto intermediário, denominado piruvato (NELSON e COX, 2011; TORTORA, CASE E FUNKE, 2011; PRESCOTT e DUNN, 1949).

Após a formação de piruvato, na presença de oxigênio, diz-se que há oxidação completa do substrato à CO_2, pela via metabólica do ciclo de Krebs, com geração de 36 ATP e formação de água devido à utilização do O_2 como aceptor final de elétrons (NELSON e COX, 2011; MURRAY et al, 1993). Contudo, quando na ausência de oxigênio, cada molécula de piruvato é descarboxilada, com liberação de CO_2, para formação de acetaldeído, que em seguida atua como aceptor de elétrons e é reduzido à etanol. No caso das espécies do gênero *Saccharomyces*, há formação de duas moléculas de etanol e duas de CO_2, para cada hexose oxidada, na chamada fermentação alcoólica, que ocorre no citoplasma (MADIGAN, MARTINKO E PARKER, 2008).

A atividade metabólica das leveduras cervejeiras gera, em grandes quantidades, os principais produtos da fermentação (etanol e CO_2). Contudo, outras rotas metabólicas podem ser necessárias para a síntese de compostos essenciais para formação de biomassa e manutenção da atividade celular, como polissacarídeos de reserva e estruturais, lipídeos, proteínas, ácidos nucléicos, etc. Dessa maneira, diversos outros metabólitos podem ser liberados no meio, denominados por subprodutos ou compostos secundários da fermentação, que influenciarão de forma significativa no paladar, aroma, textura e características finais da cerveja (DRAGONE e SILVA, 2010; LIMA et al, 2001b; KUNZE, 1999). Por este motivo, chega-se a dizer que a fermentação é a etapa responsável pela formação de até 50% das características sensoriais da bebida final.

O desempenho da fermentação alcoólica e o perfil de subprodutos gerados é estritamente dependente de diversos fatores, como: cepa e fisiologia microbiana; concentração, viabilidade e vitalidade celular; composição do mosto (extrato primitivo, teor de sólidos, nutrientes, fontes adequadas de nitrogênio, minerais, etc.); teor de oxigênio dissolvido; temperatura; pH; pressão; agitação; geometria do fermentador; dentre outros (PRIEST e STEWART, 2006).

Neste contexto, não apenas os carboidratos apresentam importante papel na fermentação. A presença de compostos nitrogenados no mosto é de fundamental relevância para o estabelecimento do perfil sensorial da bebida obtida. As fontes nitrogenadas representam cerca de 5% do mosto cervejeiro e, geralmente, estão disponíveis na forma de aminoácidos e peptídeos (obtidos a partir da etapa de hidrólise de proteínas do malte) e proteínas (KUNZE, 1999). Melhores detalhes da influência das fontes de nitrogênio sobre os

subprodutos da fermentação serão vistos na seção sobre a composição do mosto cervejeiro, mais adiante.

3.1.5.6 Remoção do *trub* frio e biomassa cervejeira

Após a fermentação, a cerveja se apresenta bastante turva. As baixas temperaturas promovem a precipitação de compostos de turbidez, denominados agora por *trub* frio. Este material consiste principalmente de complexos formados entre proteínas de alto peso molar (mais especificamente as com terminação em aminoácidos prolina) e polifenóis oxidados (taninos) ou condensados. Contudo, também estão presentes neste precipitado carboidratos de alto peso molecular, além de ácidos graxos e íons metálicos (LEWIS e YOUNG, 2001; BARCHET, 1994). Adicionalmente, a elevada concentração de biomassa celular gerada durante o processo fermentativo também intensifica a turvação da cerveja.

Para remoção destes materiais, a cerveja é mantida em repouso para ocorrer decantação natural por ação da aceleração da gravidade, são realizadas as remoções (chamadas purgas) na parte inferior do tanque de fermentação.

3.1.5.7 Fermentação secundária e maturação

Após a fermentação principal (primária), a cerveja é dita verde, e apresenta baixo teor de CO_2, bem como aroma e sabor ainda em formação (BRIGGS et al, 2004). O residual de células de levedura que permanece suspenso na cerveja promove a fermentação secundária, em baixas temperaturas. Em seguida, se dá o processo de maturação, no qual a cerveja é mantida em temperaturas entre -1 e 0 °C, de forma que a cerveja continua passando por lento processo de clarificação e de alterações bioquímicas, responsáveis por conferir as características finais de estabilidade e qualidade sensorial da bebida (BRIGGS et al, 2004; LIMA et al, 2001b).

3.1.5.8 Filtração e estabilização coloidal da cerveja

Como já mencionado, a baixa temperatura e o baixo pH da cerveja promovem a deposição de leveduras suspensas e de compostos de turvação durante a etapa de maturação (PRIEST e STEWART, 2006). Contudo, este é um processo lento e não capaz de eliminar toda turbidez do meio (LIMA et al, 2001b). Além disso, pode haver turvação e consideráveis alterações químicas no sabor da cerveja em seu pós-processamento, ou seja, nos períodos de transporte e estocagem, principalmente pela oxidação, incidência de luz, movimentação e alterações de temperatura (PRIEST e STEWART, 2006; KUNZE, 1999).

Dessa maneira, para se obter uma cerveja límpida e estável durante todo o período de validade proposto, em geral, deve-se lançar mão de técnicas de clarificação a fim de eliminar material de turvação (REINOLD, 2007; MARKOVIC, GRUJIC e PEJIN, 2003). Dentre as técnicas de clarificação, podem ser destacadas quatro, aplicadas separadamente ou combinadas, que são: a sedimentação, o uso de agentes clarificantes, a centrifugação e a filtração (PRIEST e STEWART, 2006). A filtração em terra diatomácea, combinada da adição de agentes adsorventes, é a técnica mais utilizada atualmente.

3.1.5.9 Carbonatação

Nesta etapa, deve ser ajustada a concentração de CO_2, que já pode se apresentar parcialmente carbonatada de forma natural durante a fermentação secundária. Contudo, a fermentação tem difícil controle, a pressurização é baixa e, nas etapas posteriores de processamento, pode haver perda deste gás. Devido à sua extrema importância sensorial, e para garantir uma produção homogênea, com teor de CO_2 na especificação desejada, as grandes cervejarias optam pelo processo de carbonatação forçada em tanques de pressão ou em linha (LIMA et al, 2001b; KUNZE, 1999).

3.1.5.10 Estabilização microbiológica

Apesar de a cerveja apresentar diversos fatores que contribuem para que seja um produto de difícil deterioração microbiológica (teor alcoólico, baixo extrato residual,

presença de compostos derivados do lúpulo, saturação com CO_2, pressão positiva e baixo pH), pode, ainda assim, haver desenvolvimento continuado da levedura cervejeira, bem como de micro-organismos contaminantes, sendo necessário tratamento específico de estabilização microbiológica (REINOLD, 2009). A pasteurização é a técnica mais utilizada, podendo ser feita antes do envase, pela pasteurização em linha (pasteurização *flash*), ou depois do envase, em túnel de pasteurização, nos quais a temperatura da bebida é elevada para entre 60 e 65°C por aproximadamente uma hora (BAMFORTH, 2003).

3.1.5.10 Envase

A cerveja, agora pronta, até então acondicionada em tanques de pressão, em baixas temperaturas (0°C) e com contrapressão de CO_2, deve seguir para a etapa de envase, em latas e garrafas (geralmente para ser submetida à pasteurização e comercializada como cerveja) ou em barris (quando comercializados sem pasteurização, na forma de *chopp*). Esta etapa pode ser a mais dispendiosa de todo o processo de produção (DRAGONE e SILVA, 2010).

3.2 COMPOSIÇÃO DO MOSTO CERVEJEIRO

A composição do mosto cervejeiro é de extrema importância para a atividade microbiana e para a qualidade do produto final. A fim de atender às necessidades nutricionais da levedura cervejeira, o mosto deve conter fontes orgânicas de carbono e nitrogênio (principalmente proteínas e aminoácidos), bem como fósforo, enxofre, sais minerais e vitaminas (BAMFORTH, 2003). Segundo Hough (1990), o malte, por si só, atende às condições nutricionais básicas da levedura para que se estabeleça o processo fermentativo, exceto por alguns sais minerais, que são supridos pela água cervejeira.

Os carboidratos provêm fundamentalmente do malte de cevada, podendo ser complementados pela introdução de outros cereais ou fontes açucaradas, quando utilizados como adjunto. Na cevada, como em outros cereais, os principais carboidratos presentes são polissacarídeos, sendo a maior proporção de amido (cerca de 60% m/m). Outros polissacarídeos são a celulose (principal constituinte da casca da cevada) e a hemicelulose (principal constituinte da parede celular do endosperma, rica em β-glucanas e pentosanas), que não são metabolizados pela levedura, e sua permanência no mosto pode interferir negativamente no processo. Apresenta também açúcares simples (sacarose e rafinose), contudo, em pequenas quantidades (KUNZE, 1999).

Portanto, principalmente o amido, serve de fonte de carbono e de energia para a levedura, resultando na geração de etanol e dióxido de carbono, em quantidades equimolares. Contudo, há necessidade de hidrólise prévia deste polissacarídeo, uma vez que a levedura não é capaz de metabolizá-lo.

O conteúdo de nitrogênio do mosto, consideravelmente menor que o teor de carboidrato, também apresenta importante papel na qualidade da cerveja, contribuindo para a cor e textura do mosto cervejeiro, para a formação de espuma e para a atividade microbiana durante a etapa de fermentação, entre outros. Este assunto será abordado em uma subseção separadamente.

O mosto cervejeiro também apresenta em sua composição compostos fenólicos ou polifenóis, que são substâncias químicas de complexidade variada, com um ou mais anéis aromáticos, cada um contendo um ou mais grupos hidroxilas, pouco solúveis em água, que possui propriedades antioxidantes e terapêuticas. O malte fornece 80% dos polifenóis totais presentes na cerveja, principalmente como constituintes da casca e da fração de aleurona na

parte interna do grão (LEWIS e YOUNG, 2001). O restante é proveniente do lúpulo, localizados principalmente nas brácteas, que se diferenciam dos polifenóis do malte sobretudo pelo seu alto grau de condensação e elevada reatividade (KUNZE, 1999), interferindo na estabilidade coloidal da cerveja. O teor de compostos fenólicos presentes no mosto cervejeiro é intrinsecamente dependente da etapa de moagem dos grãos de malte.

Durante as etapas de malteação da cevada, os compostos fenólicos podem ser oxidados transformando-se em polifenóis de elevada massa molar (taninos) e/ou sofrer condensação, resultando em produtos capazes de causar sabor áspero, amargor brutal e alteração da cor por complexação com íons metálicos (principalmente o ferro), bem como desestabilizar a espuma do produto final. No entanto, quando presentes em médio ou baixo peso molecular (tanóides ou antocianinas, respectivamente), os polifenóis atuam como protetores antioxidantes do mosto e da cerveja (DRAGONE e SILVA, 2010; SIEBERT, 2006; MARKOVIC, GRUJIC e PEJIN, 2003).

Ademais, os compostos fenólicos, durante o processo de produção da cerveja, sofrem complexação com proteínas de alto grau de polimerização, principalmente as ricas em aminoácidos prolina, e/ou com íons metálicos, formando os chamados *trub* quente, durante a cocção (Item 2.5.3), e *trub* frio (Item 2.5.7), durante fermentação e maturação, e até mesmo durante a vida de prateleira (KUNZE, 1999), que serão abordados adiante.

Também presentes no mosto cervejeiro, em pequenas quantidades, e até mesmo constituintes indesejáveis, estão os lipídeos. A principal fonte é a cevada, cujo percentual destes compostos gira entre 2 e 4% da massa seca do grão, presentes predominantemente no aleurona, prevalentemente apresentados na forma de triglicerídeos de longa cadeia (principalmente os ácidos esteárico, oleico, linoleico e palmítico). Tais compostos apresentam efeito negativo na qualidade da espuma da cerveja (HORNSEY, 1999). Também podem ser encontrados fosfolipídeos em pequenas quantidades. A princípio, tais lipídeos são insolúveis, podendo, contudo, ser oxidados durante o processamento e passar para a fase solúvel, alterando consideravelmente o sabor da bebida.

Outras substâncias presentes em menores quantidades são as vitaminas (principalmente B_1, B_2, C, e E), fatores de crescimento essenciais para a etapa de fermentação, encontradas, também, na camada de aleurona do malte de cevada.

A composição mineral do meio provém predominantemente da água, conquanto a casca da cevada apresente reduzido conteúdo mineral. O cálcio atua na estabilidade das enzimas do malte (principalmente na estabilidade térmica da α-amilase) e no estímulo da atividade microbiana, além de favorecer a floculação do material proteico e das leveduras ao final da fermentação. Por outro lado, íons ferro podem promover uma série de problemas, tais como, inibição enzimática, degeneração da levedura, escurecimento do mosto, redução da estabilidade coloidal devido à complexação com polifenóis, formação de sabor desagradável, e ainda causar incrustações e corrosão de equipamentos. Silicatos podem se complexar com proteínas e provocar turvação na cerveja (KUNZE, 1999; BERNSTEIN e WILLOX, 1977).

3.2.1 Compostos nitrogenados no mosto e na cerveja

3.2.1.1 Malte de cevada como fonte de material nitrogenado

Tradicionalmente, a introdução das fontes de nitrogênio no mosto cervejeiro decorre exclusivamente da utilização de malte de cevada como matéria-prima. A adição de lúpulo também pode promover um ligeiro aumento deste teor que, no entanto, pode ser considerado insignificante se comparado com o conteúdo fornecido pela matéria-prima principal. A qualidade e o teor de proteínas na cevada e no malte dependem de vários fatores, entre os quais a semeadura, a fertilização do solo e a variedade do vegetal.

Especificamente na cevada malteada, as proteínas representam o maior percentual de fontes nitrogenadas (8 a 16% m/m), embora neste cereal também se encontrem pequenas quantidades de aminoácidos e ácidos nucleicos. A maior quantidade de proteínas está localizada na parte interna do grão, dividida em dois grupos, com base na solubilidade em água, totalizando quatro tipos distintos: (i) solúveis, as proteínas celulares com ação enzimática, ou as constituintes de material de reserva, compreendendo albuminas e globulinas, equivalendo de 4 a 11% e de 15 a 30% da fração proteica, respectivamente; e (ii) insolúveis, as proteínas estruturais presentes nas paredes celulares dos grânulos de amido, denominadas proteínas histolíticas, que compreendem as hordeínas (36%) e glutelinas (30%) (HORNSEY, 1999).

3.2.1.2 Perfil dos compostos nitrogenados

As fontes nitrogenadas representam cerca de 5% do mosto cervejeiro e, geralmente, estão disponíveis na forma de aminoácidos, peptídeos e proteínas, de baixa, média ou elevada massa molar, apresentando significativos efeitos sobre características do mosto e da bebida (KUNZE, 1999). De modo geral, proteínas com alta massa molar (≥ 10^6 Da) contribuem para a textura (ou corpo) da cerveja e também para a formação de espuma, embora essas proteínas possam estar relacionadas com a turvação do produto durante o seu tempo de armazenamento (BAMFORTH, 2003). Geralmente, a maior parte das proteínas insolúveis com elevada massa molar são removidas com o bagaço de malte (O'ROURKE, 2002).

Por outro lado, as proteínas de média massa molar e os polipeptídeos derivados do malte contribuem para a sensação de refrescância da bebida, para a ressência (retenção de CO_2), e para a estabilidade da espuma (SCHONBERGER e KOSTELECKY, 2011; ONISHI e PROUDLOVE, 1994). Proteínas de baixa massa molar, assim como peptídeos e aminoácidos encontrados no mosto (massa molar ≤ 10^3 Da), são fundamentais para o metabolismo de levedura de cerveja durante a fermentação, por isso, exercem influência sobre a qualidade e quantidade de subprodutos (tais como diacetonas vicinais), mudando a composição do produto final. Podem, ainda, influenciar a cor e sabor da cerveja, devido à formação de compostos de Maillard, resultantes da interação entre compostos nitrogenados de baixa massa molar (principalmente aminoácidos) e açúcares redutores, durante a etapa de cocção do mosto (BAMFORTH, 2003; O'ROURKE, 2002; KUNZE, 1999), além de contribuir para a estabilização da espuma (DALE et al, 1989).

As proteínas são componentes do mosto que apresentam significativo efeito sobre a formação e estabilidade da espuma, seja durante a fermentação ou no produto final. Em geral, albuminas (que incluem a chamada proteína Z) e hordeínas (que incluem a proteína LTP – *lipid transfer protein*) são encontradas na espuma da cerveja (BAMFORTH, 2011). A concentração destes componentes na espuma chega ser duas vezes maior que sua concentração no mosto, e, portanto, a utilização de mostos com baixos teores destes componentes promove considerável redução na quantidade de espuma formada (KORDIALIK-BOGACKA e AMBROZIAK, 2004). Alguns estudos propõem que a presença de seus hidrolisados (reduzida massa molar) promovem aumento desta estabilidade e que a

presença isolada de cada um desses tipos de proteínas apresenta maior efeito sobre a formação da espuma do que quando estas estão presentes em conjunto no meio (KAPP e BAMFORTH, 2002; BAMFORTH e MILANI, 2004).

Além disto, a presença de diferentes aminoácidos na composição do material proteico pode ter efeito sobre diversas características destas substâncias, como ponto isoelétrico, carga superficial, hidrofobicidade e tendência de interações com outros componentes do meio (DALE et al, 1989).

O mosto contém aproximadamente 19 aminoácidos, que são consumidos (ou não) de maneira ordenada em diferentes estágios da fermentação. De acordo com a sequência de absorção pela levedura, os aminoácidos podem ser divididos em diferentes grupos. No primeiro grupo, os rapidamente absorvidos ao início do processo, dos quais ácido glutâmico, glutamina, ácido aspártico, asparagina, serina, treonina, lisina e arginina. No segundo grupo, os que são absorvidos apenas após a fase *lag* de crescimento, quando já foram absorvidos todos os do primeiro grupo (como glicina, fenilalanina, tirosina e alanina). Por fim, os aminoácidos de absorção mais lenta e de grande importância para o processo cervejeiro, como a valina, a leucina, a isoleucina e a histidina. Há ainda, um único aminoácido não utilizado pela levedura, a prolina, que permanece no mosto durante todo o processo (STANBURY et al, 1995; FIX, 1993).

3.2.1.3 Condução do processo cervejeiro e os efeitos sobre as fontes de nitrogênio

O perfil dos compostos nitrogenados presentes no mosto cervejeiro (elevada, media e baixa massa molar) depende das matérias-primas utilizadas, isto é, do tipo de malte e da cevada, da introdução de adjuntos (quantidade e origem) e da proporção cereal/água utilizada para formulação do mosto, ou pela produção de mostos de alta densidade (processo *high gravity*). Adicionalmente, também será dependente de diversos outros fatores da condução de cada etapa do processo cervejeiro, como malteação, moagem, mostura e cocção do mosto (DRAGONE e SILVA 2010; CELUS, BRIJS e DELCOUR, 2006; PRIEST e STEWART, 2006; BRIGGS et al, 2004; ANIBABA e OSAGIE, 1997).

Geralmente, o teor de nitrogênio no mosto tende a diminuir ao longo do processo, uma vez que parte destes compostos é coagulada durante a cocção do mosto, outra parte é utilizada durante a atividade metabólica da levedura durante a fermentação, e, ainda, outra

parte pode precipitar e ser removida na etapa de maturação para evitar a turvação da bebida no período de estocagem. Além disso, proteínas de elevada massa molar são constituintes primários da espuma, havendo grande perda destes componentes durante as trasfegas após a fermentação. O produto final contém entre 2 e 6 g/L de proteínas ou substâncias derivadas (CORTACERO-RAMIREZ et al, 2003).

Gorinstein et al (1999) avaliaram o teor de proteínas e de aminoácidos em mais de 15 diferentes tipos de cervejas comerciais e em diferentes fases do processo de produção. Eles determinaram a concentração de compostos nitrogenados no mosto (9,16 g/L), no mosto fermentado (8,55 g/L), na cerveja verde (8,50 g/L) e na cerveja maturada (6,37 g/L), confirmando esta redução.

3.2.1.4 Compostos nitrogenados e estabilidade coloidal

O uso de agentes adsorventes (clarificantes) como aditivos para remoção do excesso de compostos de turvação é uma prática comum nas grandes cervejarias. Estes agentes destinam-se, principalmente, à adsorção de precipitados proteico-fenólicos ou de fenóis e proteínas de alto peso molecular, separadamente. Atualmente, são utilizados o gel de polivinilpolipirrolidona (PVPP), poliamidas (nylon 66), a sílica (hidrogel ou xerogel), argilas (bentonita), colágeno e cola de peixe. Tais agentes apresentam carga líquida positiva e, portanto, interagem formando agregados (que precipitam com maior rapidez) com leveduras e substâncias que apresentam carga negativa, dentre as quais, proteínas e polifenóis (PRIEST e STEWART, 2006; BAMFORTH, 2003).

Alternativa à adição de agentes adsorventes, é a técnica que consiste na adição de uma protease prolina específica, com alta afinidade por proteínas ricas em aminoácido prolina, que são as principais causadoras da turvação, devido à sua afinidade com compostos fenólicos (NGUYVEN, van ROON e EDENS, 2007; CARVALHO, BENTO e SILVA, 2007). A prolina é o único aminoácido não consumido pela levedura durante a fermentação devido à ausência de permeasse compatível, estando, portanto, sempre presente nas etapas posteriores (REHMANJI, GOPAL e MOLA, 2005). Este preparado enzimático já tem aplicação industrial pelas grandes cervejarias, e pode ser adicionado à cerveja ainda na fermentação.

Pode-se ainda promover a adição de enzimas proteases (como papaína ou bromelina) de forma a reduzir a massa molecular de proteínas turvadoras presentes na cerveja,

diminuindo seu impacto na turbidez do meio. Ou, ainda, podem ser acrescidas enzimas tanases, que atuam sobre os polifenóis que poderiam precipitar em complexos proteicos (DRAGONE e SILVA, 2010; OLIVEIRA, 2001; KUNZE, 1999). Neste caso, a cerveja deverá passar por tratamento térmico para inativação destes complexos enzimáticos antes de sua comercialização. Pode haver, ainda, adição de ácido tânico promovendo complexação forçada com proteínas para posterior remoção dos precipitados (REHMANJI, GOPAL e MOLA, 2005; BATTESTIN, MATSUDA e MACEDO, 2004).

3.2.1.5 Compostos nitrogenados na cerveja e saúde do consumidor

Ao longo de sua história, a cerveja esteve ligada a diversas finalidades, entre elas, a alimentação diária e os usos terapêuticos (MATAIX, 2004; KONDO, 2004; SAURA et al, 2003). Por pelo menos 20 anos, numerosas investigações bioquímicas mostraram que o consumo moderado de cerveja tem muitos benefícios para a saúde de seus consumidores (SANCHEZ et al, 2010), uma vez que é uma bebida altamente nutritiva, rica em carboidratos, proteínas e aminoácidos, vitaminas, minerais, compostos fenólicos, óleos essenciais, etc. Em comparação com o vinho, seu consumo também pode contribuir substancialmente para a dieta (WRIGHT et al, 2008; DENKE, 2000).

Em relação ao teor de compostos nitrogenados, incluindo proteínas, peptídeos e aminoácidos, vários autores indicam uma concentração significativa na cerveja, que varia entre 3 e 5 g/L (BAMFORTH, 2003; GONZALEZ-GROSS et al, 2000), valor maior do que a encontrada em muitas outras bebidas, incluindo vinho (BAMFORTH, 2011;. WRIGHT et al, 2008;. CORTACERO-RAMIREZ et al, 2003). De acordo com Sanchez e colaboradores (2010), a cerveja tem na sua composição os 20 aminoácidos essenciais, e outros não essenciais, destacando-se a presença do aminoácido triptofano, que leva à produção do hormônio melatonina no organismo humano, com efeitos positivos sobre o sono e redução da ansiedade de seu consumidor.

Gorinstein et al (2002) relataram um aumento da atividade antioxidante total e uma redução significativa nos níveis de colesterol total, e de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e triglicerídeos no sangue de ratos em cuja dieta foram incluídas proteínas liofilizadas provenientes de cervejas comerciais.

3.3 RESÍDUOS CERVEJEIROS

Uma grande quantidade de resíduos agroindustriais é produzida anualmente em todo o mundo, a partir das indústrias de beneficiamento de vegetais ou na industrialização dos mais variados tipos de alimentos (CHANDA e CHAKRABARTI, 1996). O volume de resíduos gerados sofre aumentos significativos, principalmente devido ao grande aumento da população mundial e ao estilo de vida atual, que inclui o consumo de diversos tipos de alimentos processados.

Neste contexto, se enquadra o Brasil como um país de grande território e de acentuadas atividades da agropecuária e da indústria de alimentos e bebidas. Dentre estas atividades está a indústria cervejeira, que inclui em suas etapas de produção o processamento de matérias-primas vegetais, como cevada, lúpulo e outros cereais utilizados como adjuntos, gerando subprodutos ao longo de seus processos de produção.

A disposição destes resíduos no ambiente gera uma série de transtornos ao ecossistema, principalmente devido à sua composição, rica em compostos orgânicos, que lhe confere elevada demanda bioquímica de oxigênio para degradação, e devido ao seu significativo poder nutricional, que pode alterar o equilíbrio ecológico local. Os resíduos devem, então, ser tratados antes de sua disposição final, o que muitas vezes representa custos que são incluídos na cadeia produtiva para repasse ao consumidor.

Dessa maneira, há um grande incentivo atual à redução da geração de resíduos ou ao aproveitamento dos mesmos, cujas principais causas são o aumento da poluição ambiental, a escassez de matérias-primas não renováveis ou, ainda, os problemas relacionados à utilização de matérias-primas renováveis, como a competição com o ramo de alimentos ou por questões de proteção à biodiversidade.

Diversos avanços tecnológicos nos últimos 20 anos têm proporcionado à indústria cervejeira grandes economias pela menor geração de subprodutos ao longo do processo. Contudo, certos resíduos intrínsecos à produção da bebida dificilmente têm sua quantidade gerada, como o bagaço de malte, o *trub* e a levedura residual cervejeira, devido à necessidade de processamento de grãos, às características de composição química e tratamento das matérias-primas utilizadas e à necessidade de atividade microbiana durante a fermentação (PRIEST e STEWART, 2006), respectivamente.

Estes três resíduos, chamados resíduos cervejeiros úmidos, são responsáveis pela perda de aproximadamente 20 L de cada 100 litros de da água cervejeira utilizada no processo, principalmente pelo elevado teor de umidade que os compõe, entre 80 e 90%, promovendo grande arraste de mosto e perda de extrato, bem como de cerveja, a depender da fase em que o resíduo é retirado, o que acarreta a geração de significativas quantidades de efluentes (PRIEST e STEWART, 2006).

Pode ser citado ainda um quarto resíduo cervejeiro, a terra diatomácea utilizada na filtração da bebida final, para melhoria de sua limpidez e brilho. A geração deste resíduo pode ser evitada pela utilização de outros meios filtrantes, ou ainda, pela comercialização de cervejas não filtradas, naturalmente turvas, tipicamente consumidas na forma de cervejas especiais ou artesanais. Contudo, para cervejarias de grande porte e em países em que se tem por hábito o consumo de cervejas límpidas, este auxiliar filtrante é o mais utilizado.

De acordo com as quantidades médias de resíduos gerados no processo (abordadas a seguir), e com a produção de cerveja no Brasil, são produzidos cerca de 2,5 milhões de ton/ano de bagaço de malte, 37 mil ton/ano de *trub* quente, 310 mil ton/ano de levedura residual cervejeira e 18 mil ton/ano de terra diatomácea. A geração destes quatro resíduos em suas respectivas etapas do processo cervejeiro, bem como as quantidades médias geradas, serão detalhadas ainda nesta seção, e podem ser resumidas na Figura 3.2. Adicionalmente, serão descritas suas composições e características, bem como potenciais aplicações biotecnológicas.

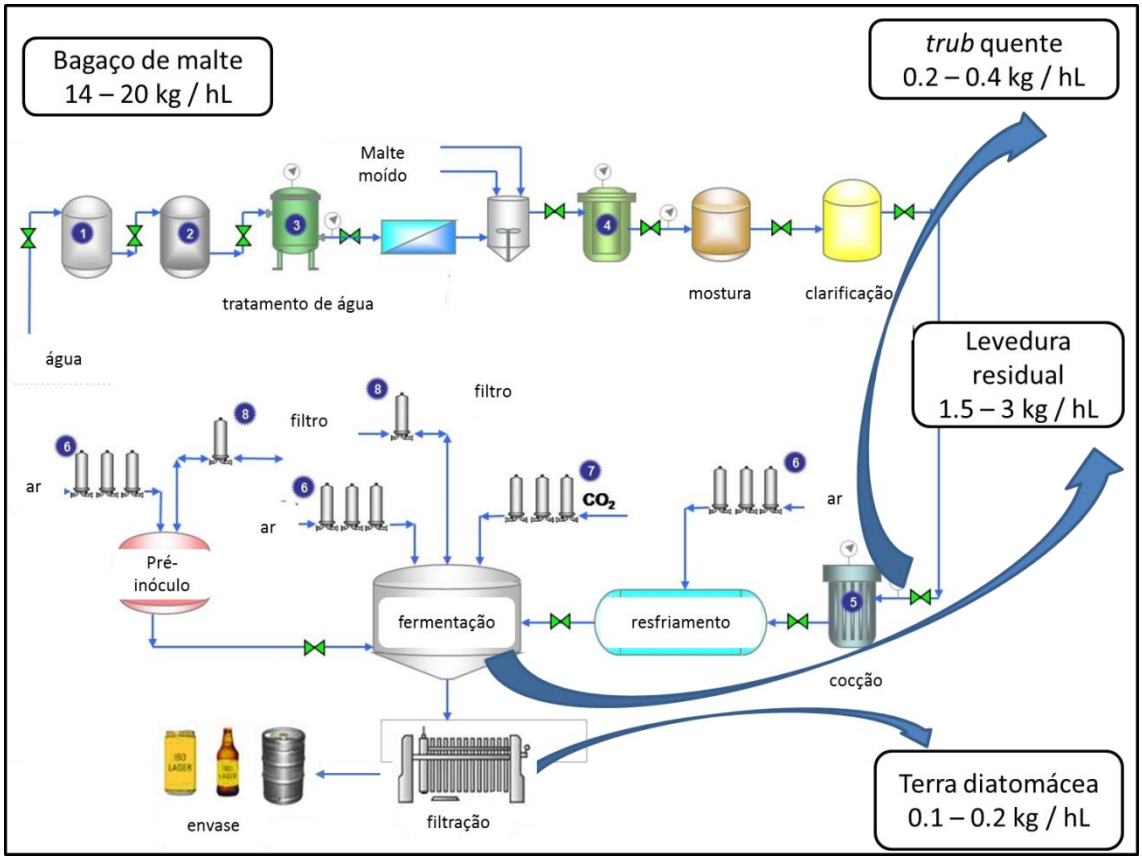

Figura 3.2: Fluxograma do processo cervejeiro e a geração de resíduos
(Adaptado de www.3m.com).

3.3.1 Bagaço de malte

O bagaço de malte é o primeiro resíduo sólido a surgir ao longo do processo, levando-se em consideração o modelo moderno de cervejarias que não contemplam a etapa de malteação, adquirindo malte pronto para utilização a partir de indústrias específicas, as maltarias. O bagaço é gerado após a etapa de mostura e esgotamento dos grãos de malte moídos, quando já foram extraídos todos os compostos solúveis de interesse para constituição do mosto doce e sua clarificação, durante a qual o bagaço exerce importante papel como torta filtrante. Constitui o resíduo sólido de maior quantidade sendo produzido em grandes volumes ao longo de todo ano, com baixo ou sem custo algum para sua aquisição, e apresentando elevado valor nutricional (ALIYU e BALA, 2011).

Este resíduo corresponde a cerca de 85% do total de resíduos gerados no processo (LIMA, 2010). Em geral, para cada 100 kg de grãos processados, são gerados 125 a 130 kg de bagaço úmido, com cerca de 80 a 85% de umidade quando obtidos em tinas de filtração, ou

50 a 55% quando obtidos em filtros prensa. Essa quantia corresponde a cerca de 14 e 20 kg de bagaço para cada hectolitro de cerveja produzida (FILLAUDEAU, BLANPAIN-AVET e DAUFIN, 2006; REINOLD, 1997), que arrasta entre 0,5 e 1% do extrato do mosto produzido (PRIEST e STEWART, 2006).

Durante a mostura, cerca de 80% da massa do grão de malte é solubilizada, permanecendo no bagaço as frações ditas insolúveis. Embora sua composição varie de acordo com a espécie da cevada e seu processo de malteação, bem como dos processos de moagem, mostura e clarificação ao qual o malte foi submetido (CELUS, BRIJS e DELCOUR, 2006; SANTOS et al, 2003), os grãos esgotados de malte são um material predominantemente fibroso, com significativo teor de proteínas, conferindo-lhe valor nutricional equivalente a cerca de 1/5 do valor da cevada (LIMA, 2010; DE-SONG, et al, 2009). Possuem entre 15 a 26,2% de proteínas e 70% de fibras, cujas frações divididas apresentam: celulose (entre 15,5 e 25%), hemicelulose (principalmente arabinoxilanas em torno de 28% com relatos para até 35%) e lignina (aproximadamente 28%). Podem conter, ainda, lipídeos (entre 3,9 e 10%), cinzas (entre 2,5 e 4,5%), vitaminas, aminoácidos e compostos fenólicos (ALIYU e BALA, 2011; LIMA 2010; ROBERTSON et al, 2010; MUSSATO, DRAGONE e ROBERTO, 2006).

Dentre os minerais, podem-se destacar cálcio, fósforo e selênio. Das vitaminas, biotina, colina, ácido fólico, niacina, ácido pantotênico, riboflavina, tiamina e vitamina B_6. Dentre os aminoácidos, se encontram leucina, valina, alanina, serina, glicina, tirosina, lisina, prolina, treonina, arginina, cistina, histidina, isoleucina, metionina, fenilalanina, triptofano e os ácidos glutâmico e aspártico (PRIEST e STEWART, 2006).

Destino usual do bagaço de malte cervejeiro é a venda para produção de ração animal, podendo, inclusive, ser adicionado de outros resíduos do processo, como o *trub*, a levedura residual cervejeira e a terra diatomácea utilizada na filtração da cerveja (BRIGGS et al, 2004). Contudo, não que este não seja um fim nobre, pode-se explorar a utilização deste subproduto de forma a esgotar ainda mais sua natureza rica em certos componentes antes de destiná-lo a este fim.

Segundo Aliyu e Bala (2011), Mussato, Dragone e Roberto (2006) e Lima (2010), diversas aplicações podem ser citadas, como: alimentação e nutrição animal e humana; produção de energia por queima direta ou por produção de biogás via fermentação anaeróbia; produção

de carvão vegetal; material adsorvente em tratamentos químicos; cultivo de micro-organismos e obtenção de bioprodutos por fermentação; suporte para imobilização celular; dentre outros. O Quadro 3.1 resume exemplos de potenciais aplicações do bagaço de malte proveniente da indústria cervejeira.

Quadro 3.1: Potenciais aplicações do bagaço de malte

Aplicações	Referências
Nutrição humana e animal	Gupta, Jaiswal e Abu-Ghannam, 2013; Steinmacher et al, 2012; Kaur e Saxena, 2004.
Bioenergia e Biogás	Gopi and Sang, 2013.
Concentrados Proteicos	Niemi et al, 2013; Faulds et al, 2009; De-Song et al, 2009; Treimo et al, 2008; Markovic et al, 1995.
Bioprocessos para produção de:	
Etanol	Gencheva et al, 2012
Ácido láctico	Mussato et al, 2008
Gomas e biopolímeros	Stredansky e Conti, 1999
Antibióticos	Khan, Rhman e Ano, 2009
Enzimas	Hashemi et al, 2011; Adeniram, Abiose e Ogunsua, 2010; Gregori et al, 2008.
Suporte para imobilização de células	Kopsahelis et al, 2007; Plessas et al, 2007; Dragone, Mussato e Silva, 2007.
Produção de mosto cervejeiro para cerveja de baixo teor alcoólico	Briggs et al, 2004.
Produção de *single cell protein* (SCP)	Wang, Sakoda e Suzuki, 2001.
Extração de óleos	Priest e Stewart, 2006.

Devido ao elevado teor de umidade, significativo valor nutricional e presença de açúcares fermentescíveis residuais, o bagaço de malte é muito instável e susceptível à contaminação microbiana, principalmente por fungos filamentosos, devendo ser eliminado da cervejaria prontamente. Dessa maneira, diferentes técnicas de conservação podem ser propostas, as quais incluem secagem, congelamento e adição de conservantes químicos. Para qualquer uma destas, geralmente a massa de bagaço é prensada para remoção do excesso de umidade, cujo teor deve ser ligeiramente reduzido para valores próximos de 65%. O líquor extraído pode retornar ao processo para recuperação de possível extrato residual presente (BRIGGS et al, 2004).

A princípio, a secagem apresenta os melhores resultados, uma vez que o alto teor de umidade pode proporcionar maior facilidade de contaminação e aumento da massa (e

volume) a ser armazenada e transportada. Contudo, elevados custos energéticos podem inviabilizar este método (ALIYU e BALA, 2011). As principais técnicas de secagem são: secagem a frio (*freezedrying*) e secagem a quente (*ovendrying*). A secagem a frio é economicamente inviável, com a vantagem de não promover alterações na composição do material. A secagem a quente, com temperaturas abaixo de 60 °C, torna-se a mais viável de aplicação (MUSSATO, DRAGONE e ROBERTO, 2006).

Técnicas de congelamento do material úmido também podem ser utilizadas, com a desvantagem do grande volume gerado, uma vez que o elevado teor de umidade não é removido. Além disto, a temperatura de congelamento pode promover alterações no estado de açúcares da composição do bagaço, por exemplo, da arabinose (MUSSATO, DRAGONE e ROBERTO, 2006). Conservantes químicos também podem ser adicionados, como amônia e os ácidos láctico, acético, fórmico, benzoico, propiônico e fosfórico, cuja proposta mantém tanto a qualidade quanto o valor nutricional. Também se podem utilizar conservantes como sorbato de potássio ou o sal comum, Na Cl (LIMA, 2010; PRIEST e STEWART, 2006).

3.3.2 *Trub* quente

O *trub* quente é o segundo resíduo sólido gerado no processo cervejeiro e resulta, predominantemente, da coagulação de proteínas insolúveis, principalmente de elevada massa molar, cujas moléculas tendem a perder água de solvatação por ação do calor, o que promove sua desnaturação. Contudo, outras substâncias podem estar presentes, devido à sua participação na formação destes complexos ou devido ao arraste durante sua deposição.

Além da coagulação proteica, a presença de cátions, principalmente Ca^{2+}, pode influenciar a neutralização de cargas negativas de proteínas e peptídeos, promovendo a formação de complexos. Compostos do lúpulo que apresentam baixam eficiência de solubilização também poderão ser precipitados, contudo, até mesmo os compostos solubilizados poderão sofrer interação eletrostática com proteínas insolúveis, precipitando juntamente com as mesmas. Pode, ainda, haver em menores quantidades a presença de proteínas de baixa massa molar, que apresentam em sua estrutura terminações em aminoácidos específicos (prolina), que sofrem interação com polifenóis (principalmente oxidados e condensados, dos quais se destacam os taninos) e carboidratos presentes do meio (PRIEST e STEWART, 2006; BARCHET, 1993). Contudo, este último tipo de precipitado é

mais comum para as etapas à frio, que compreendem fermentação e maturação, uma vez que suas interações são instáveis em temperaturas maiores que 80 °C (BRIGGS et al, 2004).

De maneira geral, a composição média do *trub* quente pode ser descrita por (em matéria seca): proteínas (50-70%); substâncias amargas do lúpulo não isomerizadas (10-20%); polifenóis (5-10%); carboidratos (4-8%), dos quais pectinas, glucanas e amido; minerais (3-5%); e ácidos graxos (1-2%) (PRIEST e STEWART, 2006; BARCHET, 1993).

Diversos fatores afetam o processo de formação do *trub*, sua composição e a quantidade depositada, como: tipo de cevada, composição, local de cultivo, efeitos sazonais e processo de secagem do malte; proporção e tipos de adjuntos utilizados; tipo de moagem dos grãos; rampas e pH do processo de mostura; concentração de íons e polifenóis no meio; tempo, homogeneização, pH (com ótimo em 5,2) e oxidação durante a fervura; extrato primitivo desejado ao mosto; tipo, concentração e grau de solubilização das substâncias do lúpulo; (PRIEST e STEWART, 2006). Agentes coagulantes e adsorventes podem ser adicionados, como a goma carragena, para intensificar sua formação (BARCHET, 1993). Em geral, formam-se entre 0,2 e 0,4 kg de *trub* úmido (80 a 90% de umidade) para cada hectolitro de cerveja produzida (BRIGGS et al, 2004).

Tal agregado insolúvel é formado por partículas grosseiramente esféricas, que tendem a se associar em flocos de aproximadamente 10 cm de diâmetro, que precipitam no meio arrastando outros componentes do mosto (HOUGH, 1990). Portanto, após a fervura, o mosto deve passar por nova etapa de clarificação para remoção deste material precipitado, uma vez que se não removidos, podem trazer problemas como: deposição em tubulações e equipamentos seguintes; alterações de pH; revestimento da levedura dificultando assimilação de nutrientes; efeito quelante diminuindo a disponibilidade de íons para a atividade microbiana; diminuição da estabilidade coloidal do produto final devido a reidratação de proteínas anteriormente coaguladas; sobrecarga na filtração do produto final; conferir amargor áspero à cerveja; desestabilização da formação de espuma devido à presença de lipídeos (PRIEST e STEWART, 2006). Contudo, alguns autores afirmam que a presença do trub pode favorecer a vitalidade e a viabilidade celular, bem como a performance do processo fermentativo, devido à presença de lipídeos, minerais e fontes proteicas (BAMFORTH, 2011; KUHBECK, et al, 2007).

Este material pode ser separado por filtração (em terra infusória ou perlita), por centrifugação, ou por decantação em tanques denominados *whirlpool*, que promovem atuação da força centrípeta e deposição do material precipitado no centro do equipamento (BARCHET, 1993), pelo efeito conhecido como xícara de chá. Esta última técnica é a mais comumente utilizada pelas indústrias. O *whirlpool* pode ser um tanque cilíndrico distinto para o qual o mosto fervido deve ser bombeado tangencialmente com entrada em altura aproximada de 1/3 da altura do tanque, ou, pode ainda, ser a própria caldeira de fervura, geralmente quando a fonte de calor é externa e permite a recirculação do material por meio de bombas. Após a aplicação de força centrípeta, é feito um período de repouso para sedimentação total dos particulados.

A remoção do *trub* promove consideráveis perdas de mosto, uma vez que sua fração aquosa corresponde à 80 a 90% de sua composição, podendo representar reduções de extrato entre 1 e 2% no mosto de apronte. Portanto, é possível a recuperação de parte deste mosto arrastado por lavagem com o próximo mosto doce, imediatamente após a saída do processo de mostura ou por centrifugação (PRIEST e STEWART, 2006). Em geral, as indústrias utilizam-se da prática de dispor o *trub* quente formado sobre o bagaço de malte na tina de clarificação, para lavagem com a água secundária, de forma a recuperar parte do extrato.

Comumente, o *trub* formado é misturado ao bagaço de malte ou outros ingredientes para elaboração de ração animal (PRIEST e STEWART, 2006), contudo, sua rica composição apresenta significado potencial para aplicação em bioprocessos, visando principalmente a exploração de sua concentração de proteínas.

3.3.3 Levedura Residual Cervejeira

Após a etapa de fermentação, há a possibilidade de reutilização da biomassa celular para inoculação de novos reatores, conforme indicado no Item 2.2.5. Contudo, ao se esgotar a possibilidade de reciclo de células, estas devem ser eliminadas do processo, gerando novo resíduo sólido denominado por Levedura Residual Cervejeira (LRC). Durante a remoção da biomassa residual, pode haver perdas entre 2 a 3% em volume de cerveja (KNUDSEN, 1978).

Novamente, os grandes volumes de produção de cerveja levam à geração de quantidades significativas deste resíduo, que apresenta elevada carga orgânica (DBO) e necessita de tratamento adequado para descarte, o que representa custos (BRIGGS et al,

2004). Dessa maneira, aplicações científico-tecnológicas apropriadas para geração de produtos de interesse devem ser estudadas.

A quantidade de biomassa microbiana residual gerada é dependente dos parâmetros da fermentação (aeração, temperatura e pH, principalmente), do tipo de micro-organismo (*S. cerevisiae* ou *S. uvarum*), da concentração do inoculo, da condição de viabilidade e vitalidade celular, bem como da composição do mosto cervejeiro. Em geral, podem ser obtidos entre 1,5 e 3 kg de massa de leveduras com cerca de 85 a 90% de umidade para cada 100 litros de cerveja produzida (OLAJIRE, 2012; FERREIRA et al, 2010; FILLAUDEAU, BLANPAIN-AVET e DAUFIN, 2006). Novamente, os grandes volumes de produção de cerveja levam à geração de quantidades significativas deste resíduo, que apresenta elevada carga orgânica (DBO) e necessita de tratamento adequado para descarte, o que representa consideráveis custos (BRIGGS et al, 2004).

De composição predominantemente proteica, a levedura residual cervejeira apresenta proteínas com teor variando entre 35 e 60 % (em base seca), as quais possuem elevado valor biológico (que se refere à quantidade de aminoácidos essenciais em sua estrutura), representando entre 70 e 85% do valor da caseína. (VILELA, SGARBIERI e ALVIM, 2000a; CABALLERO-CORDOBA, PACHECO e SGARBIERI, 1997). Dentre os aminoácidos presentes, podem se destacar a lisina, leucina, isoleucina, valina, triptofano, treonina e fenilalanina, podendo haver ligeira deficiência de aminoácidos sulfurados (YAMADA et al, 2003; CHAE, JOO, MAN-JIN, 2000; VILELA, SGARBIERI e ALVIM, 2000b; CABALLERO-CORDOBA e SGARBIERI, 2000; SGARBIERI et al, 1999).

Ademais, tal resíduo apresenta outras substâncias de importância e aplicação, como carboidratos (35 a 45 %), minerais (5 a 7,5 %, dos quais Se, Ca, P, K, MG, Fe, dentre outros), lipídeos (4 a 6 %), vitaminas do complexo B, enzimas e RNA (PINTO et al, 2013; BEKATOROU, PSARIANOS e KOUTINAS, 2006; YAMADA et al, 2003).

O atual maior destino da levedura residual cervejeira é para formulação de ração animal, podendo ser misturado ao bagaço de malte gerado no processo para aumentar seu valor nutritivo. Recentemente, novos destinos têm sido explorados, como a obtenção de produtos de elevado valor nutricional para a aplicação na indústria farmacêutica e na dieta humana, como suplementos alimentares, devido à sua rica composição e por ser geralmente reconhecida como “segura” (GRAS - *generally recognized as safe*) (MAN-JIN, 2005; BRIGGS et

al, 2004; ASSIS, 1996). Contudo, alguns fatores limitantes para sua aplicação em alimentação humana é a presença de compostos de amargor, a espessa parede celular de difícil digestão e o elevado teor de RNA, que pode causar elevação do teor de ácido úrico na corrente sanguínea e nos tecidos (SGARBIERI et al, 1999).

Diversas utilizações na área de ciência e tecnologia de alimentos, nutrição humana e animal, bioprocessos industriais e biotecnologia ambiental foram resumidas no Quadro 3.2.

Quadro 3.2: Potenciais aplicações da levedura residual cervejeira

Aplicações	Referências
Nutrição humana e animal	Man-Jin, 2005; Briggs et al, 2004.
Produção de agentes aromatizantes	Vieira et al, 2013a; Ferreira et al, 2010.
Elementos de filtração de bebidas	Reinold, 2007.
Obtenção de enzimas (invertase)	Hough, 1990.
Suplementação de meios de manutenção e fermentação	Ferreira et al, 2010; Jones e Ingledew, 1994.
Produção de *single cell protein* (SCP)	Chanda e Chakrabati, 1996.
Substrato para cultivo de microalgas	Byung-Gon et al, 2013.
Biosorção e precipitação de metais pesados (remediação de solos e meios aquosos)	Chen e Wang, 2008; Marques, Pinheiro e Rosa, 2007; Marques et al, 1999; Ferraz e Teixeira, 1999; Butt, 1993.
Bioenergia e Biogás	Zupancic, Skrjanec e Logar, 2012.

A levedura residual cervejeira pode ser comercializada na forma pastosa (como obtida após o processo fermentativo), em pó (após desidratada), ou, ainda, na forma líquida (após tratamento enzimático que aumenta sua digestibilidade) (TANGULER e ERTEN, 2008). Alguns autores indicam que o processamento para elaboração do extrato de levedura aumenta a concentração de proteínas disponíveis em relação à célula íntegra (YAMADA et al, 2003; CABALLERO-CORDOBA e SGARBIERI, 2000; VILELA, SGARBIERI e ALVIM, 2000a; SGARBIERI et al, 1999).

Caso as leveduras sejam comercializadas íntegras, em geral, deverão ser inativadas, por processos químicos ou físicos. A atuação de agentes químicos como os ácidos propiônico e fórmico, ou acetato de etila podem ser utilizados, que também acabam por contribuir com ação conservante. No processo térmico para inativação celular, estudos indicam que a 60 °C ocorre a desnaturação da membrana, mas não é suficiente para inativar todas as enzimas internas, o que ocorre acima de 75 °C. Após secas, as células podem ser armazenadas, e, se

por longo tempo, pode ser necessária a adição de ácidos orgânicos como conservantes (PRIEST e STEWART, 2006).

No caso da elaboração de extratos, a lise das células pode ser promovida por diferentes métodos, endógenos ou exógenos, como autólise, plasmólise e hidrólise. A autólise ocorre pela ação natural de enzimas endógenas quando as células concluem seu ciclo de crescimento, atingindo a fase de morte. Este processo apresenta algumas desvantagens, como baixo rendimento de extração, difícil separação sólido-líquido, sabor desagradável, e riscos de deterioração por contaminação microbiana. Na plasmólise, o aumento da concentração de sais inorgânicos promove uma aceleração da lise celular, gerando, contudo, um produto rico em sais indesejáveis. A hidrólise é o método mais eficiente, e pode se dar pela atuação de ácidos ou de enzimas, citolíticas ou proteolíticas. Apesar do elevado rendimento, a hidrólise ácida não é muito utilizada devido ao alto custo de investimento inicial e à possibilidade de formação de produtos carcinogênicos, como o mono e o dicloropropanol (CHAE, JOO e MAN-JIN, 2001).

No processamento para obtenção dos extratos, pode haver necessidade da inclusão de uma etapa de remoção de substâncias amargosas provenientes do lúpulo e do *trub*, que tendem a adsorver na superfície da célula durante a fermentação da cerveja (SHOTIPRUK et al, 2005). Esta remoção pode se dar pela passagem em resinas de adsorção (poliestireno divinilbenzeno), por microfiltração (MAN-JIN, KIM e CHAE, 2005) ou por lavagem alcalina (PINTO, 2011; SGARBIERI et al, 1999).

3.3.4 Terra Diatomácea

Terra diatomácea é o principal auxiliar filtrante em cervejarias. Trata-se de um material rico em silicatos, proveniente de fósseis de algas pré-históricas (diatomitas) (HOUGH, 1990). Apresenta grande área superficial devido à sua excessiva porosidade, atuando como um ótimo agente de filtração por profundidade. Deve ser calcinada para eliminação de compostos orgânicos e moída; representa hoje o meio de filtração mais efetivo e utilizado pela indústria cervejeira (BRIGGS et al, 2004).

Um filtro infusório convencional requer entre 1 e 2 gramas de terra diatomácea para cada litro de cerveja clarificado. Devido à retenção de material orgânico, principalmente leveduras, proteínas e polifenóis, ao final da filtração sua massa pode ter aumentado em

três vezes ou mais, que não poderá ser utilizado para novas filtrações após sua saturação (FILLAUDEAU, BLANPAIN-AVET e DAUFIN, 2006). Diversas tecnologias de recuperação vêm sendo desenvolvidas, como tratamentos químicos ou calcinação, a fim de eliminar a carga orgânica e os sólidos suspensos, para reabertura dos poros. Contudo, tais procedimentos são incapazes de regenerar totalmente o material, dificultando sua utilização em filtrações posteriores (OLAJIRE, 2012).

Dessa maneira, é gerado, então, outro resíduo sólido cuja composição mineral depende de fatores como local de origem, tempo de formação e tipo de algas que se depositaram ao longo dos anos para formar a mina de terra diatomácea. A composição orgânica, alterada pela retenção de material particulado presente na cerveja, depende do tipo de cerveja produzido e dos tratamentos das matérias-primas e do mosto. Do material orgânico presente, pode-se destacar o teor de proteínas, entre 8 e 15% (m/m) (RUSS et al, 2006).

Devido à elevada carga orgânica e grande quantidade de material suspenso ou dissolvido, a disposição deste resíduo no ambiente é extremamente dificultada. Seu lançamento no esgoto acarreta diversos problemas para tratamento deste efluente, podendo, como alternativa, ser disposto em aterros sanitários, o que, entretanto, pode ser um procedimento de custo significativo.

Seu aproveitamento também apresenta consideráveis dificuldades técnicas, principalmente devido à grande porosidade do material, que aprisiona o material orgânico, podendo ser necessária sua calcinação para remoção destas impurezas. Ademais, o alto teor de umidade (em torno de 70%) e sua composição química proporcionam sua rápida degradação, dificultando seu armazenamento em condições ambientes ou sem tratamentos prévios.

Se usado como obtido (na forma de uma lama), pequena quantidade deste resíduo pode ser misturada a solos como fonte de matéria orgânica, ou adicionado ao bagaço de malte para comercialização como ração animal, sendo, contudo, esta última aplicação de baixa aceitação (BRIGGS et al, 2004). Se tratado por calcinação, pode ser utilizado para recuperação de silicatos, destinados à aplicações em construção civil (RUSS et al, 2006).

3.4 ENZIMAS NO PROCESSO CERVEJEIRO

Diversos fatores afetam a atividade enzimática durante a mostura, como temperatura, pH, teor de água, tempo de atuação, concentração de sólidos, grau de moagem, etc. (DRAGONE e SILVA, 2010). As enzimas podem, ainda, necessitar da presença de coenzimas (compostos orgânicos) ou cofatores (íons metálicos) para seu pleno funcionamento.

Em geral, o aumento da temperatura promove incremento da atividade enzimática, cujo ótimo é atingido em diferentes patamares para cada tipo de enzima. Acima desta temperatura, sua estrutura tridimensional tende a se degradar e a enzima perde sua atividade, em um processo irreversível denominado desnaturação (BRIGGS et al, 2004). Já para temperaturas mais baixas, essa mudança de conformação pode ser reversível, à medida que se retorna à temperatura ótima de atuação (KUNZE, 1999). O pH, por sua vez, tem influência sobre a distribuição de cargas elétricas da estrutura proteica, podendo promover alterações na conformação do seu sítio ativo e desnaturação enzimática.

Em geral, o malte deve apresentar conteúdo enzimático suficiente para atuação nas macromoléculas presentes no meio, principalmente em países tradicionais na produção de cerveja ou para pequenas escalas, em que este é a única fonte de enzimas empregada no processo cervejeiro (BRIGGS et al, 2004). Contudo, alguns fatores determinantes podem levar o produtor à suplementar o mosto com a adição de enzimas exógenas, principalmente amilases e proteases de origem microbiana, para auxiliar no processo hidrolítico (LEWIS e YOUNG, 2001).

Por exemplo, a utilização de adjuntos pobres em enzimas, a utilização de maltes escuros, que foram submetidos à intensos processos de secagem e, por isso, têm sua atividade enzimática reduzida, ou, ainda, apenas para redução dos tempos de processo. Uma alternativa seria a adição direta de açúcares fermentescíveis na forma de adjuntos, principalmente por razões econômicas; entretanto, por sua definição, uma cerveja não pode ser produzida sem a presença de malte (KUNZE, 1999).

3.4.1 Proteases

Proteases são hidrolases cuja ação proteolítica atua sobre as ligações peptídicas entre os aminoácidos que compõem uma estrutura proteica, e compreendem um importante grupo de enzimas, com relevantes aplicações industriais. Apresentam significativas vantagens em

relação à hidrólise química (ácida ou alcalina), uma vez que esta, em geral, promove a degradação dos peptídeos e aminoácidos liberados, devido às drásticas condições de temperatura e pH (TAVANO, 2013).

Durante a mostura, a proteólise consiste principalmente na quebra das hordeínas, que constituem as proteínas estruturais e insolúveis em água. Contudo, não se deseja a hidrólise total deste material polimérico, de forma que sejam alcançados os diferentes objetivos, como nutrição microbiana (nitrogênio de baixo peso molecular), estabilidade coloidal e textura da cerveja (nitrogênio de médio e alto peso molecular).

As proteases do malte possuem seu ótimo de atuação em temperaturas entre 45 e 55 °C, mas não são totalmente inativadas em temperaturas mais elevadas. Estas enzimas podem ser de dois tipos. O primeiro compreende as endopeptidases, que hidrolisam a longa cadeia proteica em suas partes internas, liberando cadeias lineares de peptídeos, que são alvo do segundo grupo de enzimas, chamado carboxypeptidases (exopeptidases), que atua na extremidade da molécula, liberando um aminoácido por vez. Observa-se que em torno de 45 °C, obtêm-se maior número de produtos de baixo peso molecular (melhor atuação de exopeptidases). Contudo, para temperaturas de 55 °C, substâncias com elevada massa molar são formadas (melhor atuação de endopeptidases) (KUNZE, 1999).

A atuação deste grupo enzimático durante a mostura pode ser prejudicada, uma vez que na etapa de secagem do malte, considerável parte das proteases pode ser desnaturada, devido à sua maior sensibilidade à temperatura, sendo, às vezes, necessária a determinação da atividade proteolítica do malte e possível correção com adição de enzimas complementares (LEWIS e YOUNG, 2001).

3.5 BACTÉRIAS LÁCTICAS

As bactérias ácido-lácticas são micro-organismos amplamente utilizados na indústria de alimentos, para obtenção de ácido láctico, queijos diversos, manteigas, bebidas à base de leite ou soro de leite, vegetais fermentados, etc. As principais espécies envolvidas são dos gêneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus* (TODAR, 2015; SALMINEM, WRIGHT e OUWEHAND, 2004). Este grupo compreende micro-organismos que podem apresentar diferentes características. Quanto à fisiologia, podem ser mesofílicos (com atividade metabólica ótima entre 20 e 30 °C) ou termofílicos (com atividade metabólica ótima entre 37 e 45 °C); quanto à morfologia, podem possuir a forma de cocos ou bastonetes; quanto aos produtos de fermentação, podem ser homofermentativos (um produto principal e demais subprodutos) ou heterofermentativos (produtos variados, geralmente equimolares) (TAMIME, 2006; WALSTRA, WOUTERS e GEURTS, 2006).

No metabolismo das bactérias lácticas homofermentativas, ou homolácticas, o açúcar redutor disponível no meio é fosfatado e segue a via glicolítica, até a formação do composto intermediário piruvato. Este, por sua vez, atua como aceptor final de elétrons, e é reduzido a ácido láctico (principal produto, maior que 85% do total), pela enzima lactato desidrogenase. Já as bactérias heterofermentativas, ou heterolácticas, direcionam seu metabolismo pela via das pentoses-fosfato, com liberação de CO_2 e formação de ácido láctico e etanol no meio (TODAR, 2015; CHANDAN et al, 2006). A Figura 3.3 apresenta os possíveis caminhos metabólicos conhecidos das bactérias homolácticas e heterolácticas.

As espécies do gênero *Lactobacillus*, de significativa representatividade das bactérias lácticas, apresentam grande aplicação industrial, uma grande variedade de espécies e subespécies, com diferentes propriedades fenotípicas, fisiológicas e bioquímicas. Não apresentam formação de endoesporos; possuem dimensões entre 0,5-1,2 e 1,0-10,0 µm; não filamentam, apesar de suas células poderem se mostrar alongadas; predominantemente não apresentam motilidade; são positivas quanto ao teste de coloração de Gram; em geral microaerófilas ou anaeróbias facultativas; e raramente patogênicas. Desenvolvem-se lentamente na presença de ar e apresentam elevada taxa de crescimento em atmosfera reduzida em O_2; adicionalmente, apresentam aumento de atividade metabólica quando na presença de concentrações em torno de 5% de CO_2. Dentro deste gênero, duas espécies são

ditas obrigatoriamente homofermentativas, os *L. delbrueckii* e os *L. acidophilus* (TODAR, 2015; SALMINEM, WRIGHT e OUWEHAND, 2004; GERMOND et al, 2003; HOLT et al, 1994).

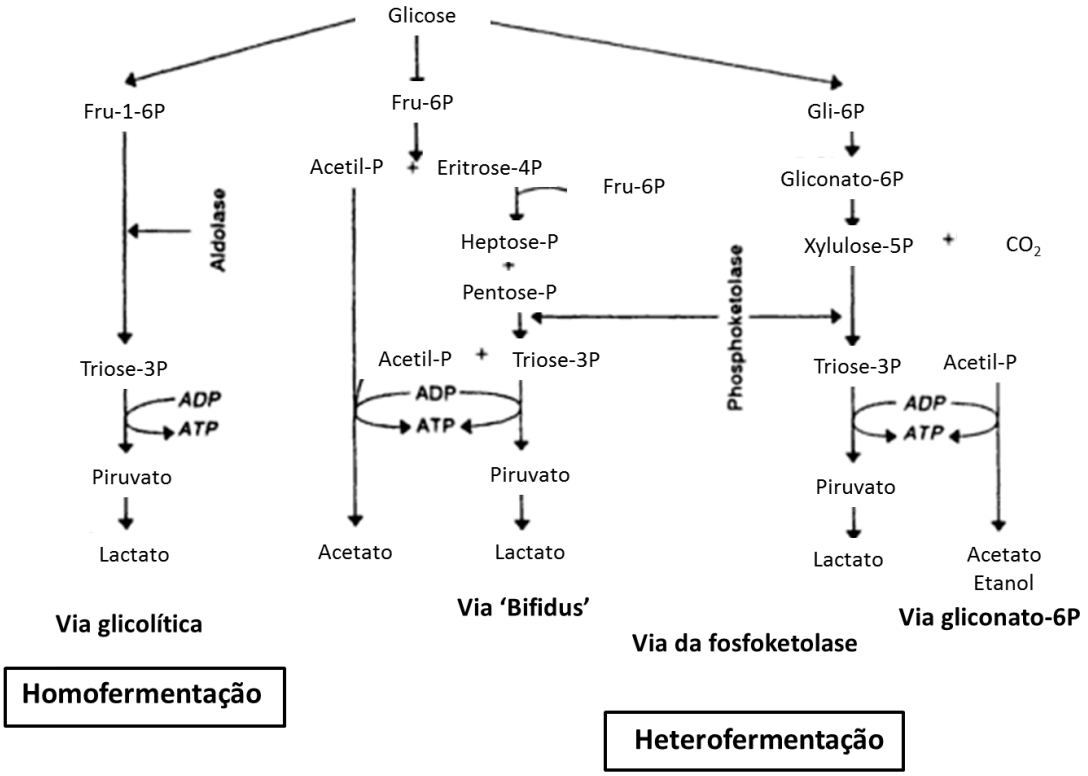

Figura 3.3: Vias metabólicas simplificadas das bactérias homolácticas e heterolácticas.
(Adaptado de: WOOD e HOLZAPFEL, 1995)

Tais micro-organismos, além de apresentarem metabolismo sensível às alterações de temperatura e pH, são significativamente exigentes quanto ao fornecimento de nutrientes, necessitando de meios ricos em fontes de nitrogênio e vitaminas para sua plena atividade e desenvolvimento (PANESAR, et al, 2007; SALMINEM, WRIGHT e OUWEHAND, 2004). Dessa maneira, as bactérias ácido-lácticas apresentam um complexo sistema de proteases e peptidases para suprimento de suas necessidades em aminoácidos essenciais, tornando-as capazes de crescer rapidamente em alimentos proteicos (GOBBETTI et al, 2005), como o leite, por exemplo, com exceção para as conhecidas como probióticas, que apresentam atividade proteolítica reduzida (SAVIJOKI, INGMER e VARMANEN, 2006; SHINATA e SHAH, 2000; LAW e HAANDRIKMAN, 1997).

Tais sistemas proteolíticos, de bactérias lácticas isoladas das mais variadas fontes, têm sido estudados extensivamente por diversos pesquisadores, de relativamente longa data (MOSLEHISHAD et al, 2013; CARPINÉ et al, 2010; KIRILOV, et al, 2009; PIRAINO et al, 2008;

MARTINS, 2006; KABADJOVA-HRISTOVA et al, 2006; TAKAFUJI et al, 1995; KOK e VENEMA, 1988). Inclusive, estes micro-organismos têm sido utilizados para a fermentação e hidrólise proteica de cereais e sementes de leguminosas (AGUIRRE, GARRO e GIORI, 2008; CAGNO et al, 2002; ABASIEKONG, 1991). Diversos produtos de interesse industrial podem ser obtidos a partir da fermentação láctica de cereais (SALMINEM, WRIGHT e OUWEHAND, 2004).

Além disto, é comum a utilização de maltes bioacidificados em adição à maltes comuns em países que seguem a Lei da Pureza, de forma que não podem incluir aditivos ao processo para, por exemplo, ajuste do pH do meio de mostura. Os maltes são acidificados naturalmente pela ação de bactérias lácticas, principalmente as do gênero *Lactobacillus*, incluindo *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *L. delbrueckii* subsp. *lactis* e *L. fermentum*. Os maltes assim obtidos apresentam menos riscos de contaminação por fungos filamentosos, bem como levam à produção de mostos e de cervejas de boa qualidade (LOWE et al, 2005; LOWE e ARENDT, 2004; BOHAK et al, 1998).

3.6 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

O planejamento estatístico de experimentos é uma ferramenta de grande valor para a otimização de processos, sejam estes já estabelecidos, ou processos em desenvolvimento, minimizando o excesso de informações e erros associados aos métodos de tentativa e erro. Planejar experimentos com fundamentos de estatística permite determinar a influência dos fatores (ou variáveis do processo) sobre as respostas observadas, e traz uma série de vantagens, como: redução do número de experimentos; análise simultânea dos fatores envolvidos; possibilidade de avaliar mais de uma resposta ao mesmo tempo; etc. (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

3.6.1 Planejamento de misturas

Conforme descrito por Cornell (1990), o planejamento de misturas leva em consideração a soma das frações molares de cada componente, que deve ser 1 para todas as misturas testadas, segundo a metodologia estatística de análise de mistura dos três componentes, onde as misturas de k dos componentes sejam correspondentes à $\sum_{i=1}^{k} x_i = 1$. A Tabela 3.2 apresenta a matriz de experimentos referente ao planejamento de misturas.

Tabela 3.2: Matriz do planejamento de misturas

Experimento	Frações molares de cada componente		
	X_1	X_2	X_3
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	1/2	1/2	0
5	1/2	0	1/2
6	1/2	1/2	0
7	1/3	1/3	1/3

Os 7 experimentos elaborados a partir destes 3 componentes são apresentados em um diagrama ternário, representado por um triângulo equilátero na Figura 3.4.

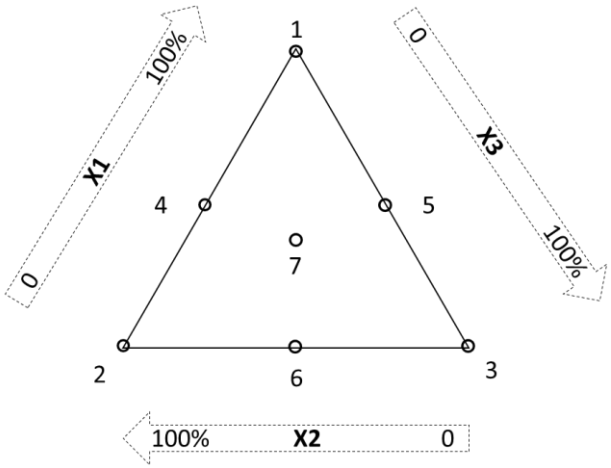

Figura 3.4: Diagrama ternário do planejamento de composição de misturas. (Xi representam os componentes).

3.6.2 Planejamento fatorial

Um planejamento experimental fatorial baseia-se na escolha das variáveis (ou fatores) de importância para o estudo, ou seja, que apresentam influência sobre as respostas a serem observadas. Escolhe-se uma faixa de variação para estes fatores e os experimentos devem ser combinados respeitando estas faixas. De modo geral, o planejamento fatorial é representado por n^k, onde k são os fatores e n é o número de níveis estabelecidos para a faixa de variação destes fatores. Pode-se, ainda, realizar experimentos em réplicas nos chamados pontos centrais (PC), com os valores médios das faixas de variação, permitindo o melhor estudo da área e o cálculo dos erros experimentais sem que sejam feitas as duplicatas de cada experimento (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

Por exemplo, um planejamento com dois fatores estudados e em dois níveis cada um deles, é representado por 2^2, e compreende um total de 4 experimentos como resultado das combinações básicas das variáveis analisadas. Utiliza-se o sinal “+” para representar o valor máximo e o sinal “-“ para o valor mínimo da faixa estudada. Em geral, duplicatas no ponto central aumentariam o número de experimentos para 6, e são representadas por “0”.

A Figura 3.5 é a representação gráfica e a Tabela 3.3 apresenta uma matriz genérica para um planejamento fatorial 2^2, com duas réplicas no ponto central.

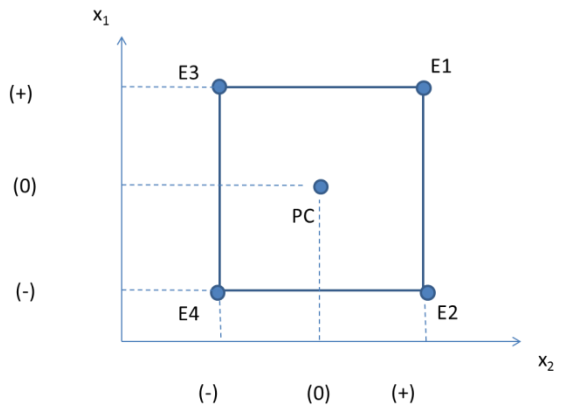

Figura 3.5: Área de estudo do planejamento fatorial de 2 níveis e 2 fatores

Tabela 3.3: Matriz codificada do planejamento fatorial de 2 fatores em 2 níveis (2^2) com duas réplicas no ponto central

Experimento	Fatores	
	X_1	X_2
1	+	+
2	-	+
3	+	-
4	-	-
5 (PC)	0	0
6 (PC)	0	0

3.6.3 Análise de variância (ANOVA)

Após a realização dos experimentos, seguindo o planejamento experimental, os resultados devem ser analisados para verificação de diferenças estatísticas entre os valores obtidos. O primeiro teste realizado é a análise de variância (ANOVA). Como ferramenta para realizar a Análise de Variância, pode ser utilizado o teste F, teste de hipóteses que verifica a variabilidade entre as variâncias de populações/tratamentos diferentes. O teste é realizado da maneira a seguir (CURI, 2008):

São propostas duas hipóteses:

Hipótese nula: Ho: s1 = s2 (as variâncias para cada tratamento são iguais).

Hipótese não nula: H1: s1 ≠ s2 (as variâncias para cada tratamento são diferentes).

Calcula-se F, da seguinte maneira: $F_{calc} = s^2_1 / s^2_2$, com s_1 maior que s_2.

O $F_{crítico}$ encontra-se tabelado.

Se $F_{calc} > F_{critico}$ a hipótese nula deverá ser rejeitada.

Teste de Tukey para comparação de médias

O teste de Tukey é realizado após serem averiguadas diferenças estatisticamente entre todos os resultados analisados, e permite a comparação entre múltiplas médias. Para tanto, deve ser calculada a diferença mínima significativa (Δ), pela seguinte fórmula:

$$\Delta = q \times \sqrt{\frac{QMres}{r}} \qquad \text{(Equação 3.1)}$$

Onde:

q = amplitude total studentizada (tabelado);

QMres = quadrado médio do resíduo;

r = número de repetições.

As médias são comparadas uma a uma e se a diferença entre elas for maior que a diferença mínima significativa (Δ), então elas diferem à uma dada significância. A diferença entre as médias é indicada por índices diferentes (números ou letras).

Capítulo 4

Caracterização dos resíduos cervejeiros

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a composição parcial dos três resíduos sólidos cervejeiros, bagaço de malte, *trub* quente e levedura residual, quanto aos teores de: umidade, cinzas, carbono total e solúvel, nitrogênio total e solúvel, proteínas bruta e solúvel, aminoácidos (FAN – *free amino nitrogen*), açúcares redutores;

- Caracterizar os resíduos quanto aos valores de: pH, acidez titulável total, e demanda química de oxigênio total e solúvel.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para caracterização e posterior utilização ao longo do trabalho, foram obtidos três resíduos sólidos do processo cervejeiro, o bagaço de malte (BM), o *trub* quente (tQ) e a levedura residual cervejeira (LRC), cujas formas de obtenção e respectivos tratamentos são descritos a seguir. A Figura 4.1 apresenta, resumidamente, o fluxo de procedimentos adotados neste capítulo, desde a obtenção até à caracterização dos resíduos cervejeiros.

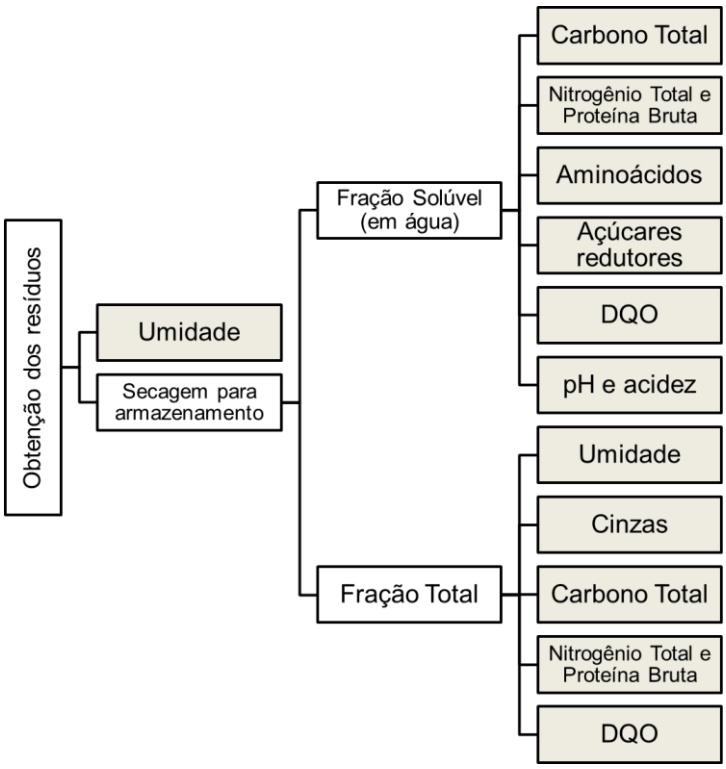

Figura 4.1: Diagrama de blocos resumido das análises dos resíduos cervejeiros
(Quadros com fundo branco representam operações ▢; quadros com fundo cinza representam análises ▢).

4.2.1 Resíduos cervejeiros

4.2.1.1 Bagaço de malte

O bagaço de malte foi doado pela cervejaria Noi (Itaipu, Niterói – RJ), imediatamente depois de retirado da tina de clarificação e misturado com pá de polietileno para amostragem. Dados como o tipo de moagem e o perfil da curva de mostura não foram fornecidos pela empresa, porém, sabe-se que o bagaço foi oriundo de um processo de obtenção de cerveja tipo Pilsen tradicional, puro malte, e a planta de produção é equipada com tinas de clarificação de mosto primário, o que requer que durante a moagem a casca

dos grãos seja mantida da forma mais íntegra possível. O bagaço foi obtido uma única vez em quantidade suficiente de modo a atender todo o trabalho experimental.

O material foi submetido à etapa de secagem, a fim de eliminar a água livre e proporcionar o armazenamento adequado sem riscos de contaminação. Para tanto, primeiramente, o bagaço foi disposto em bandejas de alumínio (Figura 4.2-A) e seco em estufa de circulação de ar (FANEM, ORION 515) a 65°C por aproximadamente 24 horas. Depois de eliminada parte da água livre, o material foi transferido para sacolas de papel (Figura 4.2-B) e mantido à mesma temperatura até que apresentasse massa constante, determinada em balança analítica (Ohaus Adventurer), em um total de 10 dias. Depois de seco, o bagaço de malte foi acondicionado em vasilhames de plástico de 14 L (Figura 4.2-C) e mantido à temperatura ambiente.

Figura 4.2: Secagem do bagaço de malte para armazenamento.
(A): bagaço úmido disposto em bandejas de alumínio; (B): bagaço parcialmente úmido disposto em sacolas de papel; (C): bagaço seco disposto em vasilhame de plástico para armazenamento.

Previamente à sua caracterização e utilização em etapas posteriores, o material foi triturado em liquidificador para aumento de sua área superficial (Figura 4.3) e facilitação da atividade microbiana (fermentação láctica, Capítulo 6). Ademais, o bagaço como obtido, tem grande capacidade de absorção de água, o que dificultaria as etapas posteriores de separação, com grande perda de material solúvel.

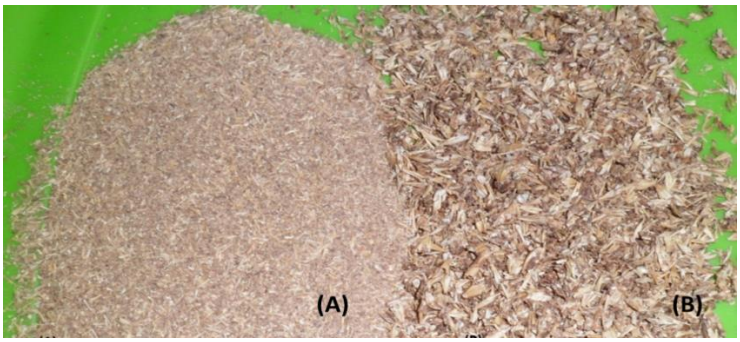

Figura 4.3: Bagaço de malte seco (A): triturado; (B): como obtido.

4.2.1.2 *Trub* quente

O *trub* quente também foi doado pela cervejaria Nói e retirado do mesmo processo de produção do qual foi obtido o bagaço de malte, imediatamente após a trasfega do mosto de apronte para o fermentador (Figura 4.4-A). Os tipos e concentrações de lúpulos utilizados, bem como os tempos de sua adição e de cocção do mosto não puderam ser informados pela empresa, mas, como já citado, tratava-se de uma etapa de preparo de mosto para obtenção de cerveja tipo Pilsen tradicional.

O material úmido, como retirado da caldeira de cocção, foi filtrado em filtros de pano para redução parcial da água presente (Figura 4.4-B). Em seguida, a massa sólida retida foi destinada à etapa de secagem para possibilitar seu acondicionamento. Foi empregada metodologia semelhante à descrita para a secagem do bagaço de malte (Item 4.2.1.1) em bandejas de alumínio em estufa de calor seco (Figura 4.4-C). Entretanto, neste caso, a massa constante foi alcançada em 4 dias, não havendo necessidade da transferência do resíduo para sacolas de papel.

O residual sólido do *trub*, após seco, foi triturado em liquidificador industrial (Figura 4.4-D) para desfazer os grumos formados durante o período de secagem em estufa. Este material foi armazenado em vasilhames plásticos de 5 L de capacidade (Figura 4.4-E), em ambiente refrigerado (22°C) e protegido da incidência luminosa.

Figura 4.4: Secagem do *trub* quente para armazenamento
(A): *trub* quente como obtido; (B): *trub* quente filtrado em coador de malha; (C): *trub* quente seco em bandejas de alumínio; (D) moagem em liquidificador industrial; (E) acondicionamento em vasilhames de plástico.

4.2.1.3 Levedura Residual Cervejeira

A levedura residual de baixa fermentação (*Saccharomyces uvarum*) foi doada pela AmBev. A cervejaria não informou as características da cerveja produzida pela fermentação com esta levedura. A empresa realizou secagem por *spray dryer*, fornecendo material desidratado, com baixo potencial para contaminação, que foi armazenado ao longo de todo o período do trabalho em frascos de vidro vedados (Figura 4.5) em ambiente refrigerado (22°C).

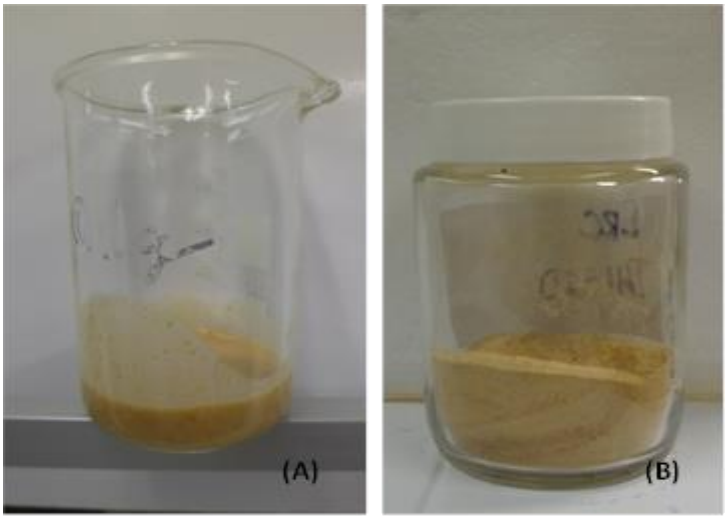

Figura 4.5: Levedura residual cervejeira.
(A) pastosa; (B) desidratada.

4.2.2 Caracterização dos resíduos

Todas as análises descritas a seguir foram realizadas no mínimo em duplicata, com resultados expressos em seus valores médios e respectivos desvios.

O teor de umidade foi determinado com base no resíduo bruto, conforme obtido na indústria cervejeira. Após secos, as frações total e solúvel (em água) dos resíduos foram submetidas às análises de composição e caracterização. Da fração total, foram obtidos os teores de umidade, cinzas, carbono total (orgânico e inorgânico), nitrogênio e demanda química de oxigênio (DQO). Da fração solúvel, foram determinados os teores de carbono total, nitrogênio, aminoácidos (FAN – *free amino nitrogen*), açúcares redutores, acidez titulável, pH e DQO.

Para obtenção da fração hidrossolúvel, três amostragens de cada resíduo foram realizadas, a fim de coletar-se 2,5 g de cada. As amostras foram adicionadas de água destilada em um volume suficiente para se estabelecer uma concentração final de 5% (m/v). Inicialmente, em béqueres de 100 mL, contendo os resíduos sólidos devidamente pesados,

foram adicionados 30 mL de água destilada e a mistura foi homogeneizada em agitador magnético por 30 min., para solubilização das frações (Figura 4.6-A). Em seguida, o material foi centrifugado sob refrigeração (4°C), à 1370 g (3500 rpm, 10 cm de raio) por 10 min. (centrífuga HERMILE, Z400) (Figura 4.6-B) e o sobrenadante foi recolhido. Ao precipitado, foram adicionados 20 mL de água destilada e o procedimento de homogeneização e centrifugação foi repetido. Após o recolhimento de toda a fração líquida, o material foi filtrado à vácuo em papel de filtro Whatman n° 4.

As amostras aquosas assim obtidas foram dispostas em frascos de penicilina de 10 mL de capacidade (Figura 4.6-C) e congeladas (-20°C), para posteriores determinações analíticas.

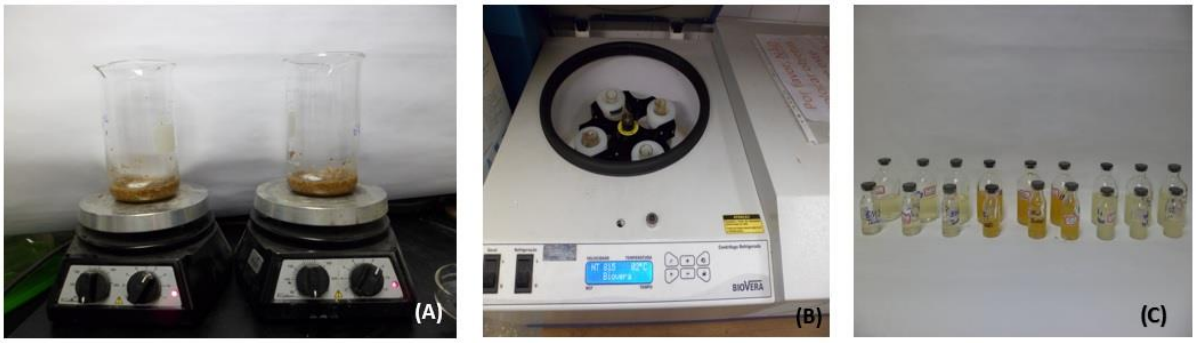

Figura 4.6: Separação da fração solúvel dos resíduos em água.
(A): solubilização em água em placas de agitação; (B): centrifugação sob refrigeração para separação das frações; (C): amostra armazenada em frascos de penicilina.

4.2.2.1 Teor de umidade

O teor de umidade dos resíduos obtidos úmidos foi determinado por método direto em balança de infravermelho (GEHAKA IV 2000), levando-se em consideração apenas a água livre, não incluindo a água de constituição. Para tanto, a balança foi pré-aquecida e amostras foram dispostas em formas de alumínio para determinação da massa seca à 105°C (AOAC, 1975), até massa constante. Devido às condições de elevadas temperaturas em que os resíduos são gerados (em torno de 80 e 100°C para o bagaço de malte e o *trub* quente, respectivamente), pode-se considerar não significativa a perda de voláteis durante a determinação da umidade.

Os teores de umidade foram obtidos pela diferença entre as massas inicial e final das amostras, e os resultados expressos em percentuais de umidade (m/m).

4.2.2.2 Resíduo mineral fixo (cinzas)

Para determinação do resíduo mineral fixo, foi realizada amostragem de cada resíduo com determinação de sua massa em balança analítica após sua disposição em cadinhos de porcelana previamente incinerados e tarados. O material foi submetido à incineração total a temperaturas entre 500 e 550°C, em forno tipo mufla (Magnos, 122004), até massa constante (AOAC, 1975).

A diferença entre a massa final do cadinho (após incineração da amostra) e a massa do cadinho vazio (previamente tarado), representou o teor de cinzas, que foi expresso em percentual (m/m de matéria seca).

4.2.2.3 Análises de carbono e nitrogênio total e proteína bruta total

Os três resíduos foram analisados quanto ao teor de carbono e nitrogênio em analisador SHIMADZU[3], no Laboratório de Tecnologia Ambiental da Escola de Química/UFRJ, sob coordenação da Professora Magali Christe Cammarota.

Os teores de carbono total e de carbono inorgânico foram determinados pela utilização do módulo para análise de amostras sólidas (SSM 5000A) acoplado ao equipamento, enquanto que o teor de carbono orgânico total (TOC) foi obtido por diferença.

Este equipamento não é capaz de quantificar o teor de nitrogênio total em amostras sólidas, de forma que os resíduos foram tratados para sua liquefação. Foram feitas três amostragens de cada resíduo para procedimento da digestão de nitrogênio, semelhante à realizada no método de Kjeldahl, utilizado para determinação do teor de nitrogênio (orgânico e amônia) total. Amostras sólidas de 0,5 g aproximadamente foram adicionadas de 20 mL de ácido sulfúrico concentrado, e 10 g de mistura sólida catalítica (selenito de sódio, sulfato de cobre penta-hidratado e sulfato de sódio deca-hidratado) em tubos de vidro específicos. Em um digestor de Kjeldahl, a temperatura foi mantida em aproximadamente 370°C, por 40 min., até a digestão completa. Depois de encerrada a digestão, a amostra foi transferida para balão volumétrico de 25 mL e avolumadas com água destilada, de forma que a diluição final foi de 0,5 g para 25 mL. As amostras líquidas assim obtidas foram armazenadas sob congelamento para posterior determinação de carbono e nitrogênio total.

[3]Analisador de C e N SHIMADZU, modelo T_{OC} – V_{CPN} por combustão e oxidação catalíticas à 680°C para determinação de carbono total na fração solúvel e combustão térmica para detecção de NO_2 por quimioluminescência para determinação de nitrogênio total na fração líquida. Para amostras sólidas, deverá ser feita a digestão ácida com H_2SO_4 P.A previamente às análises.

Os resultados do equipamento, expressos em % (m/v) foram convertidos para % (m/m) em função do volume da amostra final, após digestão, e da massa de amostra sólida utilizada.

O teor de nitrogênio total pode ser utilizado para estimar o teor de proteínas brutas em cada amostra, utilizando-se um fator de conversão em função da proporção da fração de nitrogênio presente em uma proteína. Diferentes fatores podem ser utilizados a depender do tipo de material analisado e das proteínas que o compõem. No presente trabalho, foram adotados os seguintes valores: bagaço de malte e *trub* quente, 6,25; levedura residual cervejeira, 5,8 (YAMADA et al, 2011; EBC, 2008; AOAC, 2005). Os resultados foram expressos em percentual de proteínas brutas (m/m).

4.2.2.4 Análise de carbono e nitrogênio solúvel e proteína bruta solúvel

O teor de carbono e nitrogênio total das frações solúveis previamente obtidas foi determinado em analisador SHIMADZU. Novamente, o teor de proteína bruta foi estimado pela utilização de fator de conversão adequado para cada resíduo analisado, conforme já apresentado no Item anterior (4.2.2.3).

4.2.2.5 Aminoácidos (FAN – *free amino nitrogen*)

Da fração solúvel dos resíduos cervejeiros foram retiradas amostras para determinação do teor de aminoácidos (FAN – *free amino nitrogen*) pelo método da ninhidrina (EBC, 1987; ASBC, 1976), utilizando-se a glicina como padrão. Os resultados foram expressos em mg/g de massa seca, unidade comumente utilizada para descrição do teor de FAN no mosto e na cerveja.

4.2.2.6 Açúcares redutores

Da fração solúvel dos resíduos foi determinado o teor de açúcares redutores livres pelo método espectrofotométrico do ácido DNS (AOAC, 1975). Para tanto, foi utilizada uma curva padrão de glicose, indicada no Apêndice I, que relaciona a concentração de açúcar redutor com poder redutor e a absorbância (a 540 nm) obtida após a reação com o DNS. Os resultados foram expressos em percentuais (m/m de matéria seca).

4.2.2.7 pH e acidez titulável total

Foi determinado o pH de cada resíduo quando acrescido de água, por determinação direta em pHmetro de bancada (QUIMIS). Ademais, da fração solúvel, obtida, foi quantificada a acidez total titulável com NaOH 0,1M, utilizando fenolftaleína como indicador. Os resultados de acidez foram expressos em percentual (referenciando-se a massa solubilizada de cada resíduo) (AOAC, 1975).

4.2.2.8 Demanda química de oxigênio (DQO)

A demanda química de oxigênio de cada resíduo sólido e de sua fração solúvel foi determinada segundo os métodos padrões de análises da APHA (2005).

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Teor de umidade

Os resultados destas análises, em valores médios, para os resíduos brutos (como obtidos na cervejaria) e para os resíduos após a etapa de secagem, são apresentados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1: Teor de umidade dos resíduos, bagaço de malte (BM), *trub* quente (TQ) e levedura residual cervejeira (LRC)

Resíduo	Umidade (%)	
	Bruto	Seco
BM	82,6 ± 0,1	8,3 ± 0,1
TQ	86,8 ± 0,1	7,3 ± 0,1
LRC	86,0 ± 0,1	7,8 ± 0,1

O elevado teor de umidade encontrado para o bagaço de malte analisado (82,6%) é proveniente da água cervejeira que fica retida após a clarificação do mosto doce, estando em coerência com os dados da literatura. Robertson e colaboradores (2010) determinaram o teor de umidade presente em bagaços de malte de cevada provenientes de 10 cervejarias comerciais, por secagem a 104°C até massa constante, e encontraram valores entre 75 e 80%. Santos e colaboradores (2003) avaliaram o teor de umidade de 8 lotes de bagaço cervejeiro, constituído de 80% de malte de cevada e 20% de milho, obtendo valores entre 76,8 e 78,9%. Gencheva e colaboradores (2012) determinaram o teor de umidade de cerca de 70% para o bagaço de malte de cevada obtido de cervejaria comercial, enquanto que Zhaoxia e colaboradores (2012) encontraram o teor de água de 79%. Outros autores descrevem, em trabalhos de revisão bibliográfica, percentuais de umidade entre 75 e 85% (OLAJIRE, 2012; KLAGENBOECH, THOMAZINI e SILVA, 2011).

O *trub* quente também apresentou teor de umidade elevado (86,8%), resultado do arraste de mosto na precipitação destes compostos. Não foram localizados na literatura relatos de trabalhos experimentais de determinação do teor de umidade do *trub* quente. Contudo, alguns trabalhos de revisão ou livros indicam que o mesmo tem um percentual de umidade variando entre 80 e 90% (OLAJIRE, 2012; BRIGGS et al, 2004; HOUGH, 1990), ratificando o valor encontrado no presente trabalho.

Para a levedura residual cervejeira, em sua forma dita pastosa, depois de removida dos tanques de fermentação, o valor médio do teor de umidade foi de 86,0 %, o que é decorrente do arraste de cerveja durante a purga de células no fundo do reator. Pinto e colaboradores (2013) encontraram valor médio de umidade de 74% para duas amostragens de levedura residual de cervejaria comercial. Yamada e colaboradores (2003) utilizaram em seus estudos levedura residual de destilaria, e encontraram teor de umidade de 80%. Vilela, Sgarbieri e Alvim (2000) utilizaram levedura residual de cervejaria, que também apresentou 80% de umidade. Outros autores apresentam em seus trabalhos de revisão ou livros, os valores de umidade variando entre 80 e 90% (OLAJIRE, 2012; KLAGENBOECH, THOMAZINI e SILVA, 2011; FERREIRA et al, 2010; FILLAUDEAU, BLANPAIN-AVET e DAUFIN, 2006; HOUGH, 1990).

Após a etapa de secagem em estufa de calor seco, os resíduos apresentaram baixo teor de umidade, próximo aos 8%, indicando a eficácia da desidratação, estando aptos para armazenamento ao longo de todo o período de trabalho experimental, sem riscos de contaminação e com significativa redução da massa total (ALIYU e BALA, 2011; MUSSATO, DRAGONE e ROBERTO, 2006).

4.3.2 Resíduo mineral fixo (cinzas) dos resíduos secos

Os resultados do teor de cinzas após incineração em mufla (500 – 550°C), expressos em valores médios, são apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2: Teor de cinzas dos resíduos bagaço de malte (BM), *trub* quente (TQ) e levedura residual cervejeira (LRC)

Amostra	Cinzas (% m/m matéria seca)
BM	3,85 ± 0,00
TQ	2,00 ± 0,08
LRC	5,86 ± 0,05

Os minerais presentes no bagaço de malte podem ser provenientes da composição da cevada que gerou o malte e da água cervejeira utilizada; tais minerais ficam retidos nas camadas de bagaço durante a etapa de clarificação do mosto doce. O bagaço de malte avaliado apresentou 3,85% de cinzas, valor semelhante ao encontrado em diversos trabalhos da literatura. Santos e colaboradores (2003) quantificaram o teor de cinzas em diferentes

lotes de bagaço de malte, após incineração a 900°C, obtendo valores médios entre 3,4 e 4% (em base seca). Celus (2006) encontrou o teor de 3,3% de cinzas para o bagaço obtido após mostura de malte de cevada puro. Niemi e colaboradores (2012) e Zhaoxia (2012) e seus colaboradores determinaram o teor de cinzas após a incineração a 550°C de bagaço de malte obtido de cervejarias comerciais, obtendo os valores de 4,9% e 4,4%, respectivamente. Já Adeniram e colaboradores (2010) determinaram elevado teor de cinzas, de 7,9%. No levantamento bibliográfico realizado por Aliyu e Bala (2011), foram encontrados valores entre 2,3 e 7,9% de cinzas na composição do bagaço de malte residual de cervejaria.

Estas variações observadas entre os dados da literatura e do presente trabalho podem ser decorrentes de diversos fatores que afetam a composição do bagaço de malte. Podem-se destacar, dentre estes fatores, a variedade da cevada, as condições de cultivo do vegetal, que incluem solo, clima e época do ano, e as condições de processo, como malteação, moagem, mostura e clarificação (MUSSATO et al, 2006). Sabe-se, ainda, que a composição mineral do bagaço é dependente da água cervejeira utilizada (CLERCK, 1962a).

O *trub* quente apresentou teor de cinzas inferior ao dos demais resíduos avaliados (Tabela 4.2), fato que pode ser justificado pela sua formação, predominantemente resultado da coagulação de proteínas de elevada massa molar que perdem água de solvatação em elevadas temperaturas (BARCHET, 1993). Não foram localizados na literatura trabalhos experimentais que relatassem a determinação da composição do *trub* quente; apesar disto, alguns trabalhos de revisão ou livros indicam que o mesmo tem um percentual de cinzas entre 3 e 5%, que podem apresentar influência positiva sobre o processo de coagulação proteica (PRIEST e STEWART, 2006). O *trub* tem sua composição variada predominantemente em função do tipo de malte e lúpulo utilizados, bem como da condução de etapas como moagem e mostura do malte, que podem acarretar liberação de diferentes compostos no mosto, mais ou menos propícios a coagulação/complexação (PRIEST e STEWART, 2006).

O resíduo mineral fixo (cinzas) encontrado para a levedura residual (5,86%) teve seu valor de acordo com a literatura e pode-se dizer que é proveniente da composição da célula, que apresenta minerais atuando como cofatores enzimáticos e em seu sistema respiratório. Diversos autores encontraram valores ligeiramente mais elevados, entre 6,98 e 8,55% (COSTA, MAGNANI e CASTRO-GOMEZ, 2012; VILELA, SGARBIERI e ALVIM, 2000; CABALLERO-

CORDOBA e SGARBIERI, 2000). Já Santucci e colaboradores (2003) e Yamada e colaboradores (2003) encontraram valores próximos a 6% de cinzas no autolisado de levedura. No último trabalho citado, o teor determinado foi de 4,6% para as células de levedura íntegras. Pinto e colaboradores (2013) encontraram valor inferior, próximo a 2%.

Diferenças na composição da levedura residual podem ser ocasionadas por variações como a espécie utilizada (*S. cerevisiae*, de alta fermentação, ou *S. uvarum*, de baixa fermentação). Além disto, sua composição mineral pode ser influenciada em função da etapa do processo em que é removida (fermentação ou maturação) e do número de vezes que a mesma é reutilizada. Segundo Clerck (1962b), a levedura jovem e em propagação apresenta mais reservas de fosfatos, o que acarretaria mais cinzas. Não foram localizados trabalhos mais recentes que levassem em consideração a fase de atividade de levedura cervejeira para determinação de sua composição.

4.3.3 Determinação do teor de açúcares redutores solúveis

Os resultados de concentração de açúcares redutores, com seus respectivos desvios, estão indicados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3: Teor de açúcares redutores livres solúveis do bagaço de malte (BM), do *trub* quente (TQ) e da levedura residual cervejeira (LRC), em base seca

Amostra	ART (% m/m matéria seca)
BM	0,65 ± 0,05
TQ	20,0 ± 0,0
LRC	1,30 ± 0,0

Há poucos relatos na literatura a respeito da determinação do teor de açúcares redutores solúveis nos resíduos cervejeiros. O baixo teor de açúcares redutores obtido para o bagaço de malte (0,65%) corrobora com os dados de literatura que indicam o bagaço de malte como material predominantemente fibroso e proteico (ALIYU e BALA, 2011; LIMA 2010; ROBERTSON et al, 2010; MUSSATO et al, 2006). Por outro lado, Gencheva e colaboradores (2012) determinaram o teor de açúcares redutores presentes em bagaço de malte pelo método do DNS, obtendo resultado mais elevado, de 2,4% (m/m de matéria seca). O principal fator que pode afetar a presença de açúcares redutores no bagaço de

malte é a lavagem da torta de filtração com água secundária, realizada para esgotar as frações solúveis e aumentar o rendimento final da etapa de mosturação.

O baixo valor de açúcares redutores solúveis encontrado para a levedura residual (1,3%) também está de acordo com o esperado, uma vez que a levedura apresenta em sua maior proporção carboidratos na forma de polissacarídeos constituintes da parede celular e de reserva. O arraste de mosto fermentado durante a remoção destas células do fundo do reator (purga) ao final da fermentação/maturação pode promover o arraste de açúcares redutores residuais da fermentação, que estão presentes no resíduo em sua forma pastosa.

A exceção para esta análise foi o *trub* quente, que apresentou elevado teor de açúcares redutores (20%), o que está de acordo com sua formação durante o processo cervejeiro, cuja precipitação proteica durante a cocção e sua deposição promovem arraste de mosto rico em açúcares fermentescíveis. Segundo Priest e Stewart (2006), a deposição do *trub* quente promove arraste de mosto e perdas entre 1 e 2% de extrato fermentescível, em função da técnica de separação adotada e de sua operação.

4.3.4 Teor de carbono total dos resíduos secos

Conforme observado na Tabela 4.4, os três resíduos apresentaram elevado teor de carbono total em sua composição. Vale ressaltar que simultaneamente foi determinado o teor de carbono inorgânico, não tendo sido detectada sua presença. Portanto, o teor de carbono total pode ser associado ao carbono orgânico total (TOC) para os três resíduos avaliados.

Tabela 4.4: Teor de carbono total do bagaço de malte (BM), do *trub* quente (TQ) e da levedura residual cervejeira (LRC), em base seca

Amostra	C_{total} (% m/m matéria seca)
BM	52,3 ± 0,9
TQ	50,5 ± 0,3
LRC	45,6 ± 0,6

O bagaço de malte contém em sua estrutura diferentes compostos orgânicos de cadeia carbônica, dos quais, e em ordem de maior para menor concentração, podem-se destacar a hemicelulose, lignina, celulose e proteínas. Não foram localizados trabalhos na literatura que avaliassem a concentração de carbono no bagaço de malte. Contudo, diversos trabalhos

avaliaram o poder energético deste resíduo. Supondo-se fazer uma analogia entre o poder de queima do carbono (781,9 kcal/100 g) e os valores encontrados na literatura para o conteúdo energético bruto do bagaço de malte, teremos o que segue. No bagaço de malte utilizado no presente trabalho, o valor de energia bruta teórico seria de 409 kcal / 100g de matéria seca. Diversos autores determinaram o conteúdo energético do bagaço de malte, obtendo valores entre 428 e 532 kcal/100 g de matéria seca (CORDEIRO, EL-AOUAR e GUSMÃO, 2012; ALBUQUERQUE, 2009; VIEIRA, SANTOS e VIEIRA, 2009; COSTA et al, 2006).

Já a levedura cervejeira, que apresenta predominantemente cadeias carbônicas como proteínas e carboidratos em sua estrutura celular, apresentou elevado teor de carbono em sua composição (45,6%). Conhecidamente, uma célula microbiana tem cerca de 50% de carbono em sua massa seca (TORTORA, CASE E FUNKE, 2011). Por exemplo, Belluco (2001), citando Harrison (1971), indica que uma célula de levedura contém entre 45 e 47% de carbono em sua composição, de forma que a concentração encontrada no presente trabalho é bastante próxima à encontrada por este autor.

O *trub* quente apresentou elevada concentração de carbono que também pode ser associada à presença de açúcares redutores em grande concentração (20%), como já visto anteriormente. Não foram encontrados relatos na literatura para a composição em carbono deste resíduo.

4.3.5 Teor de nitrogênio total e solúvel e de proteínas brutas

A Tabela 4.5 apresenta os resultados das análises da fração total e da fração solúvel, de percentuais de nitrogênio obtidos no analisador de carbono e nitrogênio SHIMADZU, e de percentuais de proteínas brutas, obtidos a partir da relação do teor de nitrogênio total e fator de conversão adequado para cada resíduo.

Tabela 4.5: Teor de nitrogênio total e solúvel e de proteínas totais e solúveis do bagaço de malte (BM), do *trub* quente (TQ) e da levedura residual cervejeira (LRC), em base seca

Amostra	N_{total} (% m/m seca)	Proteína Bruta* (% m/m seca)	$N_{solúvel}$ (% m/m seca)	Proteína Solúvel* (% m/m seca)
BM	4,3 ± 0,4	26,9	0,37 ± 0,07	2,3
TQ	8,0 ± 0,2	48,8	0,14 ± 0,00	0,9
LRC	9,1 ± 0,0	45,6	2,53 ± 0,01	14,7

*Teor obtido a partir do fator de conversão de nitrogênio total em proteínas.

O teor de proteína bruta total determinado no bagaço de malte foi de 26,9%, valor este obtido pela utilização do fator de conversão (de nitrogênio em proteínas) de 6,25, utilizado em diversos trabalhos. Robertson e colaboradores (2011) e Faulds e colaboradores (2009) encontraram o teor de proteínas próximo a 18%, enquanto Celus e colaboradores (2006) encontraram valor mais próximo ao obtido neste trabalho, 26,7%. Segundo Clerck (1962a), o bagaço de malte úmido contém 5% de proteína bruta; considerando-se a umidade em 80%, isto equivale a 25% da matéria seca, semelhante ao encontrado no presente estudo. Estas pequenas variações podem ser consequência de diferenças no tipo da cevada, da adição de adjuntos, e das condições de moagem, mostura e clarificação do mosto doce.

Para o *trub* quente (48,8% de proteínas) foi adotado o mesmo fator de conversão de nitrogênio total em proteínas utilizado para o bagaço de malte (6,25), tendo em vista ser este a principal origem das proteínas que o compõem. Trabalhos de revisão indicam entre 50 e 70% de proteínas na composição do *trub* quente (PRIEST e STEWART, 2006; BARCHET, 1993). Mello (2008) propôs que o *trub* quente é predominantemente proteico, com teores entre 50 e 60% de sua massa seca. Para esta medida, de considerável valor, foi observada pouca variação em relação aos dados da literatura, principalmente pela formação do *trub*, que é resultado da coagulação proteica durante a cocção.

O teor de proteínas na levedura residual cervejeira (52,7%) foi obtido pela utilização do fator 5,8 de conversão de nitrogênio total em proteína bruta. Vilela e colaboradores (2000b) e Yamada e colaboradores (2003) também utilizaram o fator 5,8, enquanto Caballero-Cordoba e Sgabieri (2000) e Pinto e colaboradores (2013) utilizaram o fator 5,5. Estes autores encontraram o teor de proteína variando entre 35,2 e 47,19%, em base seca, da biomassa celular. Belluco (2001), citando Harrison (1941), indica que uma célula de levedura contém entre 7 e 9% de nitrogênio em sua composição, valor semelhante ao encontrado no presente trabalho (9,1%). Clerck (1962b) indica que, em geral, o teor de matérias nitrogenadas na levedura é de 45%, podendo chegar até a 70%, dependendo de seu estado fisiológico. Franco (1989) afirma que o levedo de cerveja em pó apresenta 46,1% de proteínas em sua composição centesimal.

Quanto ao teor de proteínas solúveis, os baixos valores encontrados para o bagaço e o *trub*, 2,3 e 0,9%, respectivamente, podem ser justificados pela forma como estes resíduos são gerados. O bagaço é esgotado de toda sua fração solúvel durante a passagem da

denominada água secundária ou de lavagem, enquanto que o *trub* quente é proveniente principalmente da coagulação e insolubilização de proteínas no mosto durante a etapa de cocção (BARCHET, 1993), resultando, ambos os casos, em materiais com baixa fração solúvel de proteínas. Já o valor mais elevado para a levedura cervejeira (14,7%) pode ser explicado pela possibilidade de lise celular durante seu processo de secagem, que se deu por *spray dryer*, liberando para o meio material intracelular rico em nitrogênio solúvel.

4.3.6 Teor de aminoácidos (FAN) da fração solúvel

O teor de aminoácidos apresentou seu maior valor para a levedura residual cervejeira, 4,09 mg/g (Tabela 4.6), coerente com sua significativa composição de nitrogênio solúvel, e tal resultado pode ser atribuído aos constituintes celulares que se apresentam dispersos no meio possivelmente devido ao rompimento das células que se apresentam frágeis e susceptíveis à autólise ao final da fermentação, bem como ao processo de secagem em *spray dryer* ao qual estas foram submetidas. Diversos autores afirmam o elevado valor nutricional da levedura residual cervejeira devido sua composição em aminoácidos, dos quais lisina, leucina, isoleucina, triptofano, dentre outros (YAMADA et al, 2003; VILELA et al, 2000a; VILELA et al, 2000b; CHAE et al, 2001).

Tabela 4.6: Teor de aminoácidos (FAN – *free amino nitrogen*) da fração solúvel do bagaço de malte (BM), do *trub* quente (TQ) e da levedura residual cervejeira (LRC), em base seca

Amostra	FAN* (mg/g matéria seca)
BM	0,36 ± 0,03
TQ	0,22 ± 0,02
LRC	4,09 ± 0,04

*expresso em equivalentes de glicina

O *trub* quente apresentou o menor teor de aminoácidos (0,22 mg/g), uma vez que sua composição é predominantemente rica em proteínas de elevada massa molar desnaturadas e complexadas pela ação do calor, que se tornam insolúveis no meio, não arrastando os aminoácidos, que por sua vez são solubilizados no mosto.

O bagaço de malte apresentou teor ligeiramente maior que o do *trub* (0,36 mg/g), contudo, mais que dez vezes menor que o teor presente na levedura residual. Novamente, tal comportamento pode ser associado ao esgotamento de praticamente toda fração solúvel

do bagaço pela sua lavagem com a água secundária, que irá compor o mosto cervejeiro. Aminoácidos comumente presentes no bagaço de malte são: leucina, valina, alanina, serina, glicina, tirosina, lisina, prolina, dentre outros (PRIEST e STEWART, 2006).

4.3.7 pH e acidez titulável total

A Tabela 4.7 apresenta os valores de pH e acidez total para os resíduos cervejeiros avaliados.

Tabela 4.7: pH e acidez titulável total do bagaço de malte (BM), do *trub* quente (TQ) e da levedura residual cervejeira (LRC)

Amostra	pH	Acidez total (% m/m)
BM	5,41	3,64 ± 0,06
TQ	4,62	7,48 ± 0,26
LRC	5,87	32,72 ± 0,29

O bagaço de malte apresentou pH coerente com a faixa de pH utilizada para a etapa de mosturação do processo cervejeiro, etapa na qual é obtido o mosto doce pela atuação enzimática e extração de componentes hidrolisados do malte. A atividade destas enzimas hidrolíticas é fortemente influenciada pelo pH do meio, e, de modo geral, a mistura malte e água tem seu pH ajustado para a faixa denominada ótima, que está entre 5,4 e 5,8 (AIYER, 2005; BAMFORTH, 2003; REGULY, 1996). A baixa acidez titulável do bagaço de malte (3,64%) pode ser resultado do esgotamento de suas frações para obtenção do mosto, contudo, compostos como aminoácidos, ácidos fenólicos e ácidos graxos constituintes da cevada (KUNZE, 1999) podem ser os responsáveis pela presença da acidez, mesmo que reduzida.

O reduzido valor de pH do *trub* quente (4,62) em relação ao bagaço de malte pode ser relacionado ao seu processo de formação durante a cocção do mosto. O *trub* quente é formado durante a etapa de cocção do mosto cervejeiro, na qual, em geral, ocorre a precipitação de fosfato de cálcio, que acarreta em redução do pH do meio (BRIGGS et al, 2004; BAMFORTH, 2003; KUNZE, 1999). Durante seu processo de remoção, o *trub* arrasta considerável quantidade de mosto (PRIEST e STEWART, 2006), o que justifica a diminuição de seu pH em relação aos demais resíduos. Ademais, em sua composição estão frações ácidas do lúpulo, que não foram solubilizadas no meio durante a cocção, bem como ácidos

graxos (HORNSEY, 1999; HAUNOLD e NICKERSON, 1993; BARCHET, 1993), que podem promover aumento de sua acidez titulável (7,48%), conforme observado.

O pH da levedura residual cervejeira (5,87) apresentou-se maior que o pH final da cerveja, que normalmente está na faixa entre 4,2 e 4,5 (BRIGGS et al, 2004). Tal fato pode ser explicado pela possível lise de células de levedura devido ao seu estágio avançado de desenvolvimento e durante seu processo de secagem, havendo liberação de material intracelular, cujo pH é em torno de 6,0 (Clerck, 1962b). Sua elevada acidez (32,72%) pode estar associada à presença de ácidos orgânicos fracos (que não promovem redução de pH) como ácidos graxos e aminoácidos.

4.3.8 Demanda química de oxigênio (DQO)

A Tabela 4.8 apresenta os valores obtidos para a determinação da demanda química de oxigênio das frações total e solúvel de cada resíduo. Conforme observado, a DQO da fração total dos três resíduos apresentou-se significativamente maior que a DQO das respectivas frações solúveis, uma vez que os três resíduos são sólidos predominantemente insolúveis em água, devido à sua composição. Entretanto, a avaliação da DQO da fração solúvel se faz importante uma vez que, durante o despejo de resíduos sólidos em corpos hídricos, ocorre sua decantação e apenas sua fração solúvel fica disponibilizada.

Tabela 4.8: Demanda química de oxigênio das frações sólida e solúvel dos resíduos cervejeiros, bagaço de malte (BM), *trub* quente (TQ) e levedura residual cervejeira (LRC)

Amostra	DQO (mg O_2 / g amostra)	DQO solúvel (mg O_2 / g amostra)
BM	1092 ± 220	44 ± 4,5
TQ	1450 ± 30	366 ± 36
LRC	1308 ± 93,5	252 ± 25

O bagaço de malte contém até 70% de fibras e em média 20% de proteínas (insolúveis) em sua composição (ALIYU e BALA, 2011; LIMA 2010; ROBERTSON et al, 2010; MUSSATO, DRAGONE e ROBERTO, 2006). O *trub*, por sua vez, é resultado da precipitação de compostos insolúveis no mosto, como complexos de proteínas, ácidos fenólicos (do malte de cevada e do lúpulo) e polissacarídeos (não hidrolisados na mostura) (BARCHET, 1993), o que acarreta baixa solubilização de seus compostos em água. Apesar da célula de levedura estar susceptível à lise, liberando material intracelular solúvel, sua parede e membrana consistem

de materiais polissacarídicos insolúveis (TORTORA, CASE e FUNKE, 2011; MADIGAN, MARTINKO e PARKER, 2004), havendo menor contribuição para a fração solúvel deste resíduo.

Segundo Ramalho (1983), referência para tratamento de efluentes líquidos, a razão DQO/COT reflete as características da matéria orgânica presente nos diferentes resíduos. Quanto mais distantes de zero, pode-se dizer que há maior facilidade de oxidação total da matéria. Valores de 2,1, 2,9 e 2,9 foram obtidos para bagaço de malte, *trub* quente e levedura residual, respectivamente; valores próximos ao indicado por este autor para a sacarose (2,44), substrato comumente utilizado na indústria de bioprocessos.

De modo geral, foram observados elevados valores de DQO, que indicam a impossibilidade de disposição destes resíduos no ambiente sem tratamento prévio, uma vez que poderão alterar significativamente as características nutricionais do ecossistema. Desta maneira, atendendo aos atuais apelos de reutilização de materiais, principalmente rejeitos agroindustriais, para promover maior esgotamento de suas frações orgânicas, bem como pelo uso racional de matérias-primas de origem renovável, e para o desenvolvimento de processos mais verdes e/ou sustentáveis, os resíduos cervejeiros apresentam grande potencial para aplicação em bioprocessos industriais.

4.4 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, foi possível concluir que:

- Os três resíduos apresentaram elevado teor de umidade (entre 82 e 87%), condizentes com sua geração nas respectivas etapas do processo;
- Foi observada, para os três resíduos, elevada carga orgânica em sua composição (TOC em torno de 50%), com elevada DQO (> 1000 mg/g), ambos os valores coerentes com suas origens, vegetal e biomassa microbiana;
- Como esperado, o *trub* quente e a levedura residual cervejeira apresentaram maior teor proteico (quase 50%) e, portanto, menor relação C/N em comparação ao bagaço de malte (26,9% de proteínas), que é predominantemente celulósico. A levedura residual teve maior quantidade de compostos nitrogenados (nitrogênio total e aminoácidos) na fração solúvel do que o bagaço e o *trub*.
- O *trub* apresentou elevado teor de açúcares redutores (20%), provavelmente devido ao arraste de mosto durante sua remoção do meio.

Tais resultados permitem supor que os três resíduos apresentam-se em potencial para utilização em bioprocessos industriais, devido à sua rica composição em matéria-orgânica. No presente trabalho, foram utilizados para a fermentação láctica, visando à obtenção de ácido láctico e de extrato proteolítico.

Capítulo 5

Seleção de bactérias lácticas com atividade proteolítica

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar a cultura láctica de melhor desempenho proteolítico através de testes específicos de crescimento microbiano em meios proteicos;
- Delinear o perfil de crescimento microbiano de cada cultura de forma a padronizar o inóculo;
- Determinar a relação entre a absorvância e a massa seca para a cultura selecionada.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Bactérias Lácticas

Para seleção das bactérias lácticas quanto à atividade proteolítica, foram empregadas seis culturas microbianas, cinco de procedência comercial e uma de coleção de culturas. Foram utilizadas culturas puras e mistas, a fim de verificar a possível influência da protossimbiose entre as diferentes espécies de bactérias lácticas. As informações das culturas utilizadas são resumidas na Tabela 5.1.

Tabela 5.1: Culturas de bactérias lácticas para avaliação da atividade proteolítica

Cultura	Espécie(s)	Origem	Observações
Pura	*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* INCQS 383/ATCC 9649	FIOCRUZ/INCQS	Liofilizada
Comercial 1	*L. acidophilus*	Leiba®	Liofilizada; $1,7 \times 10^9$ células/g.
Comercial 2	*L. acidophilus, Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* e *Streptococcus thermophilus*	BioRich®	Liofilizada; $2,5 \times 10^6$ UFC de cada espécie/g.
Comercial 3	*S. thermophilus* e *L. bulgaricus*	Docina®	Liofilizada 1×10^6 UFC de cada espécie/g.
Comercial 4	*L. casei*	Yakult®	Cultivo em leite
Comercial 5	*L. paracasei*	Ninho®	Cultivo em leite

5.2.2 Meios de crescimento e condições de cultivo

O meio de crescimento utilizado nas etapas de ativação e propagação das culturas lácticas foi o caldo MRS (Man-Rogosa-Sharpe / HIMEDIA), amplamente empregado para cultivo de lactobacilos (BRUNO, 2011; de MAN, 1960) e indicado pela coleção de culturas da FIOCRUZ. O caldo MRS apresenta pH final de 6,5±0,2, ótimo para a atividade das bactérias lácticas, já tamponado para comercialização de forma a evitar a brusca redução do pH resultante da liberação de ácido láctico como produto do metabolismo microbiano.

O meio foi preparado conforme informações do fabricante e esterilizado em autoclave a 0,5 atm (110°C) por 20 min. Antes da utilização, foi submetido a teste de esterilidade pela incubação em estufa bacteriológica a 37°C por 48 h, tendo em vista sua rica composição.

Para a ativação e propagação de todas as culturas, o meio estéril foi inoculado e incubado a 37°C em estufa de vácuo, que por ser vedada para troca de gases permitiu a modificação da atmosfera interna pela queima de vela, com consumo parcial de O_2 e liberação de CO_2, de modo a proporcionar a condição de microaerofilia (SHAH, KHAN e JAFFRERY, 2013; AL-HAMADANY, 2013; OKAPARA, OKOLO e UGWUANYI 2012; TORTORA, CASE e FUNKE, 2011; BHATIA et al, 1989) necessária para o crescimento de bactérias lácticas (HOLT et al, 1994).

Inicialmente, a cultura de *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, proveniente do banco de cepas, foi ativada e propagada, para obtenção de massa suficiente de células para estoque e uso em diferentes ensaios. Para tanto, o material liofilizado na ampola de vidro foi assepticamente reidratado com cerca de 0,2 mL do meio MRS e, em seguida, transferido para tubo de ensaio contendo 5 mL do mesmo meio (Figura 5.1-A), que foi mantido a 37°C, em atmosfera de microaerofilia, como já citado (Figura 5.1-B). Após incubação por 48 h e constatada a turvação do meio (Figura 5.1-C), e garantida sua pureza (técnica de coloração diferencial de Gram), foi realizada a etapa de propagação que consistiu nas inoculações (10% v/v) consecutivas em novos meios MRS (Figura 5.1-D).

Após o crescimento celular, este cultivo foi distribuído em tubos Falcon de 50 mL de capacidade, na medida de aproximadamente 35 mL, e centrifugado sob refrigeração (Thermo Scientific – Haraeus Megafuge 16R) a 4°C, aproximadamente 8.000 x g, por 15 minutos (AGUIRRE, GARRO e GIORI, 2008; DI CAGNO et al, 2002) para precipitação das células (Figura 5.1-E). O sobrenadante límpido foi descartado e a biomassa celular depositada ressuspendida em glicerol (20% v/v), utilizado como agente crioprotetor (MOSLEHISHAD et al, 2013; KIRILOV et al, 2009; KABADJOVA-HRISTOVA et al, 2006). A suspensão de células foi homogeneizada e distribuída em frascos Eppendorf estéreis, na quantidade de 1 mL por frasco (Figura 5.1-F), e congelada em *freezer* doméstico a -20°C. Dessa maneira, foram obtidas culturas estoque e lotes semelhantes para uso em cada inoculação.

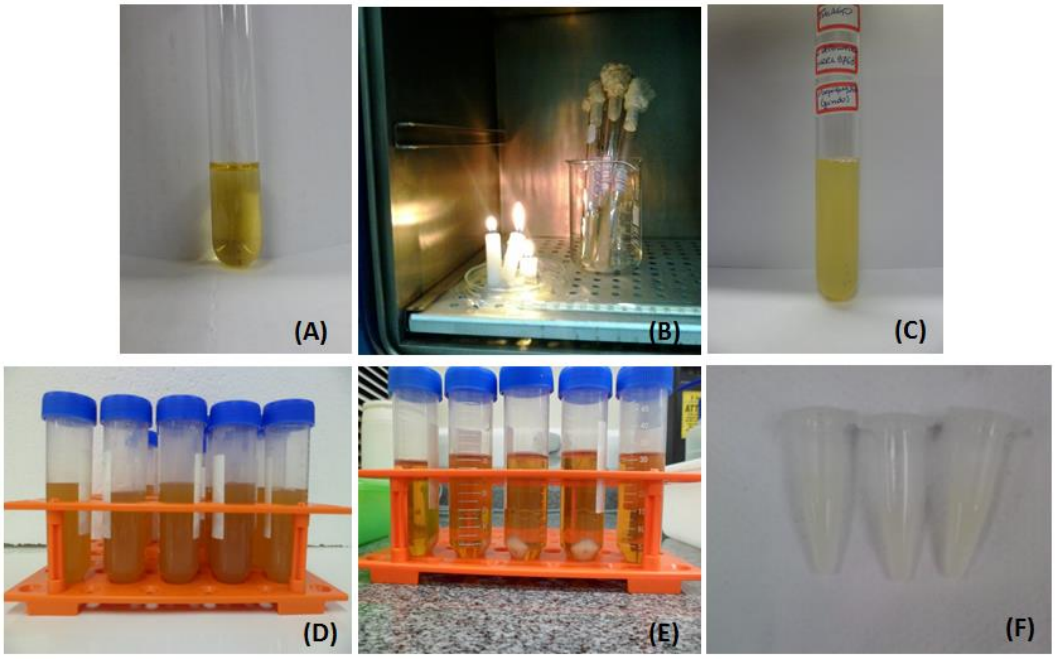

Figura 5.1: Etapas de ativação, propagação e conservação da cultura INCQS383
(A): meio MRS estéril; (B) estufa selada para incubação em atmosfera de microaerofilia gerada pela queima de velas; (C) meio MRS turvo, indicativo do crescimento celular; (D) tubos Falcon com cultivo de 24 h; (E) tubos Falcon mostrando sobrenadante límpido e células depositadas após centrifugação; (F) frascos Eppendorf usados para congelamento da cultura.

As culturas de *L. casei* (comercial 4) e *L. paracasei* (comercial 5), obtidas a partir de leites fermentados comerciais, foram repicadas (0,5 mL) em caldo MRS (10 mL) e crescidas por 12 horas a 37°C e atmosfera de microaerofilia. O procedimento foi repetido por 3 vezes até que a cultura estivesse melhor aclimatada ao novo meio. As demais culturas comerciais, liofilizadas, foram adquiridas em quantidades suficientes para utilização ao longo do estudo, de modo a utilizar células de um mesmo lote.

Durante todas as etapas de ativação e propagação, a morfologia dos micro-organismos e a ausência de contaminação do cultivo foram avaliadas por observação ao microscópio de preparações coradas segundo a técnica de coloração diferencial de Gram (LOCQUIN e LANGERON, 1983; WISTREICH e LECHTMAN, 1980). A Figura 5.2 apresenta a morfologia microscópica das culturas empregadas neste estudo.

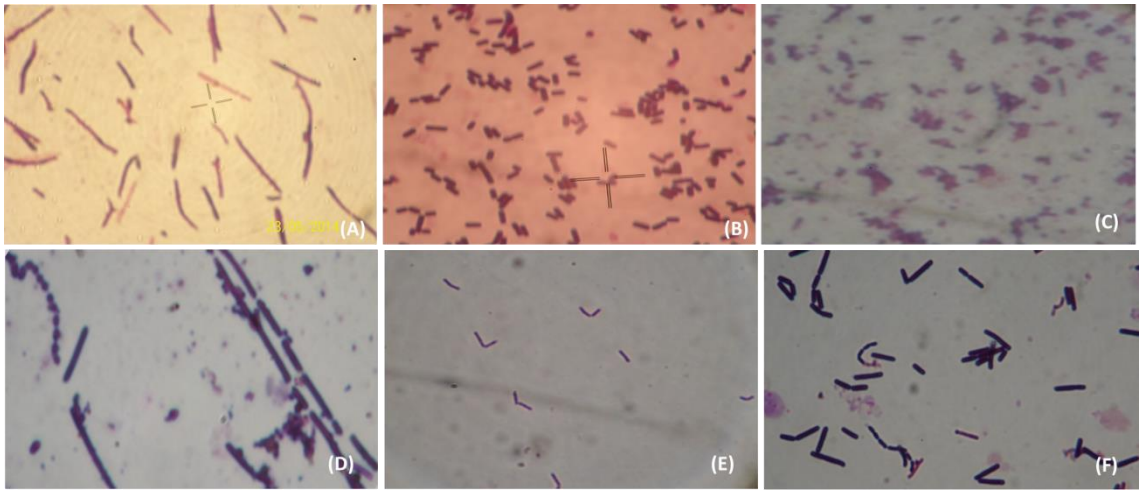

Figura 5.2: Morfologia microscópica das culturas coradas pela técnica de Gram (aumento 1000 x)
(A) *L. delbrueckii subsp. delbrueckii;* (B) comercial 1 – *L. acidophilus*; (C) comercial 2 – *L. acidophilus*, *B. animalis* subsp. *lactis*, *S. thermophilus*; (D) comercial 3 - *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*; (E) comercial 4 – *L. casei*; (F) comercial 5 – *L. paracasei*.

5.2.3 Desenvolvimento Experimental

5.2.3.1 Pré-seleção de bactérias lácticas para avaliação da atividade proteolítica

Nesta etapa, foi realizada uma pré-seleção de duas culturas de bactérias lácticas, entre as 6 escolhidas para o estudo (Item 5.2.1). Inicialmente foi avaliada a atividade proteolítica do extrato bruto obtido a partir da centrifugação de cultivo das diferentes bactérias lácticas em caldo MRS. O cultivo com 16 h foi centrifugado (8.000 x g, 15 min., 4°C) e filtrado em membrana de microfiltração de poro 0,22 µm, sendo obtido um extrato enzimático bruto, extracelular (TERZIC-VIDOJEVIC et al, 2014; GEREZ et al, 2012; GONZALEZ et al, 2010; Di CAGNO et al, 2003; WILLIAMS, NOBLE E BANKS, 2001; GOBETTI et al, 1999). O extrato assim obtido foi submetido à determinação de sua atividade pelo método da azocaseína (CHARNEY e TOMARELLI, 1947).

Em segunda etapa, o cultivo foi feito em caldo MRS modificado (modificação própria). A formulação deste meio se deu a partir da determinação do teor de nitrogênio total no meio MRS em pó. O meio preparado teve suas fontes tradicionais de nitrogênio (peptona, extrato de carne e extrato de levedura) substituídas por caseína, como única fonte de nitrogênio, considerando-se o fator de conversão de nitrogênio total da caseína em proteína de 6,38

(INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). As culturas de bactérias lácticas foram inoculadas no meio MRS modificado mantida a 37°C para atividade microbiana. A atividade proteolítica foi observada pela intensidade de formação de coágulo proteico, devido à redução do pH do meio até o ponto isoelétrico da caseína (pH 4,6), decorrente da liberação de ácido láctico como produto do metabolismo celular (TAMIME, 2006).

5.2.3.2 Perfis de crescimento e determinação da atividade proteolítica das culturas lácticas pré-selecionadas

Depois de selecionadas duas culturas com indicativo de maior atividade, um terceiro teste foi realizado, em placas de Petri contendo meio ágar proteico. Para tanto, foi necessário delinear os perfis de crescimento das duas culturas previamente selecionadas (Item 5.2.3.1), para delimitação das fases de crescimento. As culturas estoque foram descongeladas (linhagem INCQS 383) ou reidratadas (cultivo liofilizado) e transferidas para frascos Erlenmeyers contendo caldo MRS. O material foi incubado a 37°C em estufa, em condições de microaerofilia (Figura 5.1-B), conforme anteriormente mencionado (Item 5.2.). Para delineamento do perfil do crescimento microbiano foi determinada a turvação do meio a cada hora, como resultado da multiplicação celular, em espectrofotômetro (HACH DR500), tendo como branco da análise o meio MRS estéril. Inicialmente, foi realizada a varredura de comprimento de onda de cada cultivo, estabelecendo-se o ponto de máxima absorção.

Para determinação dos parâmetros de crescimento (taxa específica de crescimento, μ, e tempo de geração, tg na fase exponencial), as curvas de crescimento foram traçadas em escala logarítmica, de forma a evidenciar o perfil linear da fase exponencial. Definida a fase exponencial do crescimento, os pontos foram linearizados pela utilização da operação inversa (logaritmo neperiano, ln) e o valor de μ foi definido como o coeficiente linear da reta. O tempo tg, que corresponde ao tempo necessário para duplicação da massa celular, foi obtido pela relação $tg = (\ln 2)/ \mu$ (SCHMIDELL et al, 2001).

Em um segundo ensaio, após determinados os perfis de cada crescimento, amostras de cada cultura foram utilizadas para determinação da absorvância, da massa seca (105°C até massa constante) permitindo a obtenção de relações entre os métodos de quantificação celular.

O teste de atividade proteolítica se deu em placas de Petri contendo meio ágar, com leite desnatado (1%) e caseína (0,1%) (determinação da atividade caseolítica). Cada cultivo, em plena fase exponencial, foi inoculado (10 µL) no centro das placas contendo os meios solidificados. Após 48 h de incubação a 37°C, foram feitas medições do tamanho da colônia e do halo de degradação no meio ao seu redor (YELMETTY et al, 2014; ALFONZO et al, 2013; MOSLEHISHAD et al, 2013; CARPINE et al, 2010; KABADJOVA-HRISTOVA et al, 2006; MOULAY et al, 2006).

Considerando os contornos irregulares do crescimento celular e da degradação proteica, as determinações das áreas da colônia e do halo, para cada cultura, foram realizadas a partir da medição das massas de papel ofício, de gramatura estimada (valor médio de 0,07596 g/cm²), correspondentes aos respectivos formatos, desenhados e recortados manualmente (procedimento modificado pelo autor deste trabalho). As massas foram definidas em balança analítica ao décimo de miligrama.

Com base nos dados obtidos, foram calculados os seguintes parâmetros:

- Massa do papel (colônia + halo) – MPCH (g);
- Área total (Colônia + halo) – AT (cm²) = gramatura do papel / MPCH;
- Massa do papel (colônia) – MPC (g);
- Área do halo – AH (cm²) = gramatura do papel / (MPCH – MPC);

Ademais, foi determinada a massa seca de células inoculadas ao centro da placa, para que determinar a relação entre a quantidade de células inicialmente presente e a degradação no meio. A avaliação da atividade proteolítica foi feita com base na relação área do halo / concentração celular inicial (AH/CC), sendo CC em mg/mL. Adicionalmente, foram medidas as distâncias médias entre as bordas da colônia e do halo de degradação com auxílio de um paquímetro, para dar suporte à análise.

5.2.3.3 Curva padrão da absorvância x massa seca para quantificação celular

A cultura láctica de melhor atividade proteolítica, determinada no Item 5.2.3.2, teve sua massa de células secas relacionada à densidade óptica do meio. Para tanto, a cultura foi cultivada em caldo MRS até que a fase estacionária fosse atingida, quando, então, amostras foram retiradas e diluídas 2, 5, 10 e 20 vezes. As amostras diluídas tiveram determinadas a sua absorvância (480 nm) e sua massa seca (em balança de infra- vermelho). A correlação foi feita pela construção de uma curva padrão. O espectro foi zerado a cada leitura com o meio MRS estéril devidamente diluído.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Pré-seleção de bactérias lácticas para avaliação da atividade proteolítica

O extrato bruto obtido a partir da centrifugação dos cultivos de bactérias lácticas em caldo MRS não apresentou atividade proteolítica. Este resultado também foi encontrado por dois trabalhos da literatura (Di CAGNO et al, 2003; GOBETTI et al, 1999), embora outros autores tenham determinado a atividade de proteases em procedimentos semelhantes (TERZIC-VIDOJEVIC et al, 2014; GONZALEZ et al, 2010; DONKOR et al, 2007). O caldo MRS é um meio nobre, próprio para ativação e cultivo de bactérias lácticas, disponibilizando todas as fontes necessárias para sua atividade, não exigindo a produção de enzimas proteolíticas extracelulares. Diversos outros autores que avaliaram a atividade proteolítica de extratos brutos obtidos a partir do cultivo de bactérias lácticas utilizaram meios com fontes complexas de proteínas, como leite, leite desnatado, soro de leite, meio caseína, triptona de caseína, etc. (PESCUMA et al, 2008; IKRAM-UL-HAQ e MUKHTAR, 2006; El SODA et al, 2003; SHINATA e SHAH, 2000; DAKO et al, 1995).

A Figura 5.4 apresenta os cultivos em meio MRS modificado (por adição de caseína), cujos valores de pH foram medidos, estando todos entre 4,4 e 4,5. Não foi observado crescimento para a cultura comercial 2, contendo *L. acidophilus, B. animalis* subsp. *lactis* e *S. thermophilus*, e, por isso, não foi apresentada sua ilustração na figura. Conhecidamente, as culturas lácticas probióticas possuem baixa atividade proteolítica (SAVIJOKI, INGMER e VARMANEN, 2006; SHINATA e SHAH, 2000; LAW e HAANDRIKMAN, 1995). Por conseguinte, as culturas lácticas probióticas disponíveis no mercado, em geral, são adicionadas de culturas tradicionais, ou *starters* (como *S. thermophilus* e *L. bulgaricus*) para aumentar a eficiência da fermentação láctica. No caso da cultura comercial 2, houve adição de *S. thermophilus* que em comparação com *L. bulgaricus* apresenta baixa atividade proteolítica (WALSTRA, WOUTERS e GEURTS, 2006; TAMIME e ROBINSON, 2000; BEHMER, 1999).

A cultura comercial 3, que apresenta o cultivo misto de bactérias lácticas tradicionais da produção de iogurte (*S. thermophilus* e *L. bulgaricus*) apresentou baixo crescimento no meio (quase não perceptível ao olho), possivelmente devido à escassez de aminoácidos, essenciais para o desenvolvimento das bactérias lácticas. Este resultado indica a baixa atividade proteolítica desta cultura microbiana mista, e o cultivo não foi apresentado na Figura 5.4.

Para os demais cultivos, observou-se uma intensa formação de coágulo, visível, para as culturas comercial 4 (*L. casei*) e comercial 5 (*L. paracasei*). Este resultado pode indicar a presença de atividade proteolítica capaz de degradar a caseína na quantidade suficiente para que houvesse atividade celular e consequente redução do pH do meio, ocasionando a coagulação proteica. Contudo, tal atividade não foi suficiente para degradar a grande parte das moléculas de proteínas, evitando sua coagulação ao ser atingido seu ponto isoelétrico (pH 4,6).

O cultivo de *L. acidophilus* apresentou coágulo de baixa consistência (por observação visual), enquanto que o cultivo da linhagem *L. delbrueckii* subsp. *delbrueck*i INCQS 383 permaneceu praticamente liquefeito, com a formação de um coágulo muito fraco. Estes resultados, por sua vez, indicam a que a atividade proteolítica extracelular foi mais intensa que para os demais cultivos, sendo suficientes para degradação de grande parte da caseína presente no meio, evitando sua coagulação com a redução do pH.

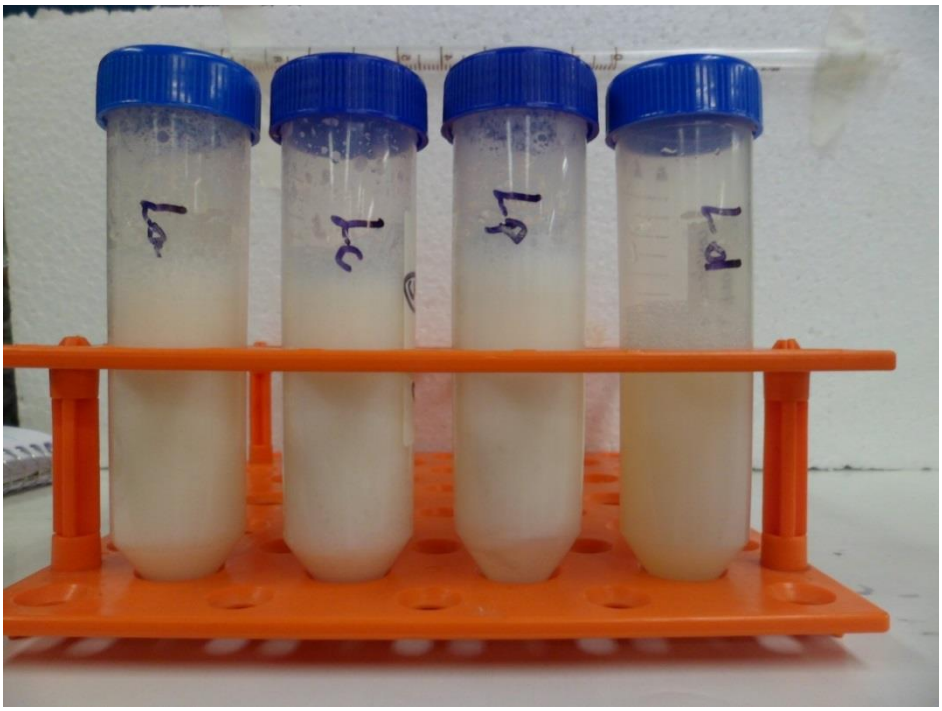

Figura 5.4: Cultivo das bactérias lácticas em meio MRS modificado por adição de caseína como fonte única de nitrogênio. La: *L. acidophilus* (comercial 1), Lc: *L. casei* (comercial 4), Lp: *L. paracasei* (comercial 5), Ld: *L. delbrueckii* subsp. *delbrueck*i INCQS 383.

5.3.2 Perfis de crescimento e determinação da atividade proteolítica das culturas lácticas pré-selecionadas

Para a realização do teste em placa de Petri, foram utilizadas as culturas de *L. acidophilus* (comercial 1) e de *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* INCQS 383, por terem apresentado os melhores resultados no teste anterior (Item 5.3.1), quando cultivadas em caldo MRS modificado. Os perfis do crescimento destas culturas em caldo MRS, determinados pela medida das absorvâncias (480 nm) em intervalos de 1 h até atingir a fase estacionária, são mostrados na Figura 5.5.

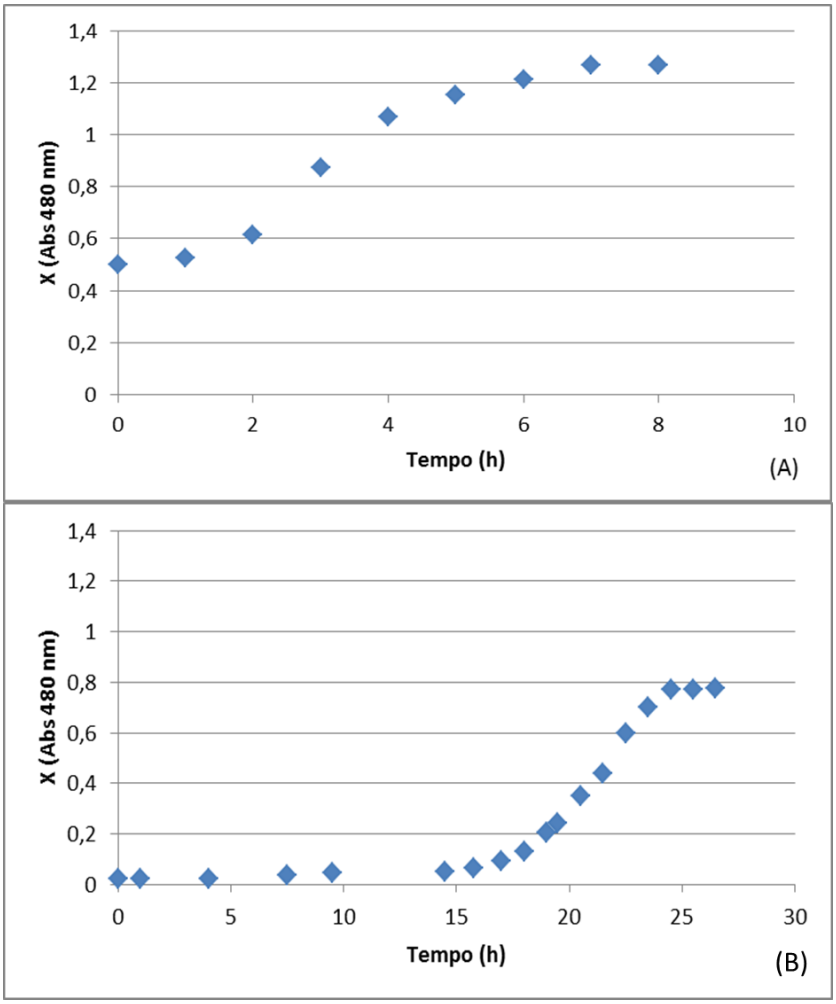

Figura 5.5: Curvas de crescimento dos cultivos de bactérias lácticas dada pela determinação da absorvância do meio em função do tempo. X é a concentração celular indicada em Abs. (A): comercial 1: *L. acidophilus*; (B) *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*.

Analisando a figura, observa-se a existência de fase *lag* (também denominada fase de adaptação) para as culturas testadas; resultado esperado tendo em vista que foram

utilizadas como inóculo culturas liofilizadas ou congeladas, ou seja, em estado de latência. Porém, o tempo de duração desta fase variou em função da cultura empregada, sendo o maior período (aproximadamente 15 h) observado para a linhagem INCQS 383, que foi preservada por congelamento. A cultura comercial, liofilizada, apresentou crescimento a partir de 2 h após inoculação, aproximadamente. Em cultivos consecutivos (dados não apresentados), não foi observada fase de adaptação para nenhuma das culturas.

Em face ao prolongado período de adaptação, a linhagem INCQS 383 apresentou valor máximo de crescimento somente depois de decorridas 24 h, enquanto que, para a cultura comercial 1 (*L. acidophilus*), a fase estacionária foi atingida em tempo menor, de aproximadamente 7 h.

Os maiores tempos de duração da fase *lag* e de crescimento microbiano, observados para a linhagem INCQS 383, podem ser associados ao método de conservação (congelamento a -20°C). Sabe-se que esta prática resulta em elevada mortandade devido à formação de cristais e aumento da concentração de soluto, ambos relacionados à taxa de congelamento (HUNTER-CEVERA e BELT, 1996). Adicionalmente, o processo de descongelamento também pode promover perda de viabilidade das células, pelo mesmo motivo de formação de cristais. Já o material de origem comercial, disponibilizado na forma liofilizada, é preparado de acordo com metodologia bem estabelecida, além de conter elevada concentração celular para compensação das perdas e de não precisar de ser descongelado, apenas reidratado.

Observa-se que a linhagem INCQS 383 apresentou a menor concentração inicial de biomassa (indicada pela menor absorvância determinada no tempo zero), que pode ter ocasionado longo tempo até que a alteração da turvação fosse detectável pelo espectrofotômetro. Apesar disto, esta cultura apresentou variação da concentração celular ($\Delta abs \approx 0,8$) semelhante a do cultivo comercial 1.

Definida a fase exponencial de cada cultivo, foram calculados os parâmetros do crescimento, indicados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2: Parâmetros cinéticos de crescimento microbiano

Cultivo*	**μ (h^{-1})****	**tg (h)****	**Final da fase exponencial (DO_{480})**
Comercial 1	0,25	2,8	0,9 – 1,1
L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii	0,33	2,1	0,6 – 0,7

*Comercial 1: *L. acidophilus;*** μ, taxa específica de crescimento; tg, tempo de geração.

Pode-se observar que os cultivos de *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* (INCQS 383) e *Lactobacillus acidophilus* (comercial 1) apresentaram taxas específicas de crescimento (μ) e tempos de geração (tg) bem semelhantes. O tempo de geração de bactérias, em geral, varia de 0,5 a 3 h, dependendo da espécie e das condições de cultivo (PELCZAR, REID e CHAN, 1977). Zacharof, Lovitt e Ratanapongleka (2009) determinaram valores de μ variando de 0,22 a 0,32 h^{-1}, e tg (2,13 e 3,13 h) para diferentes espécies de *Lactobacillus*, inclusive *L. delbrueckii*. Portanto, os parâmetros das culturas pura e comercial 1 estão em consonância com a literatura. Tempos de geração consideravelmente grandes para cultivos de bactérias podem estar associados ao metabolismo anaeróbio, como também a característica fastidiosa das bactérias lácticas (SAVIJOKI, INGMER e VARMANEN, 2006).

A Tabela 5.3 apresenta as correlações de massa seca de células e densidade óptica do cultivo (absorvância) ao final do crescimento. Nota-se que o cultivo de *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* apresentou a menor concentração de massa de células por volume de meio, em relação aos demais cultivos avaliados.

Tabela 5.3: Correlação entre absorbância e massa seca de células

Cultivo*	**DO_{480}****	**Massa células (mg/mL)**
Comercial 1	1,240	59,0
L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii	0,630	29,0

* Comercial 1: *L. acidophilus;*
**Valor considerado a diluição feita para a leitura na faixa de confiabilidade do aparelho.

O crescimento microbiano nas placas contendo meio ágar caseína foi observado pela formação de colônia no meio, enquanto a atividade proteolítica (caseolítica) das bactérias foi estabelecida em função do halo de degradação do meio sólido ao redor de cada colônia, por indicar a liberação e difusão de enzimas extracelulares com atividade proteolítica (Figura 5.5). Os valores obtidos são apresentados na Tabela 5.4.

Entre as culturas puras avaliadas neste teste, comercial 1 – *L. acidophilus*, e INCQS 383 – *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, um maior crescimento foi observado para a segunda. A Tabela 5.4 apresenta os parâmetros calculados para a determinação da atividade proteolítica dos diferentes cultivos.

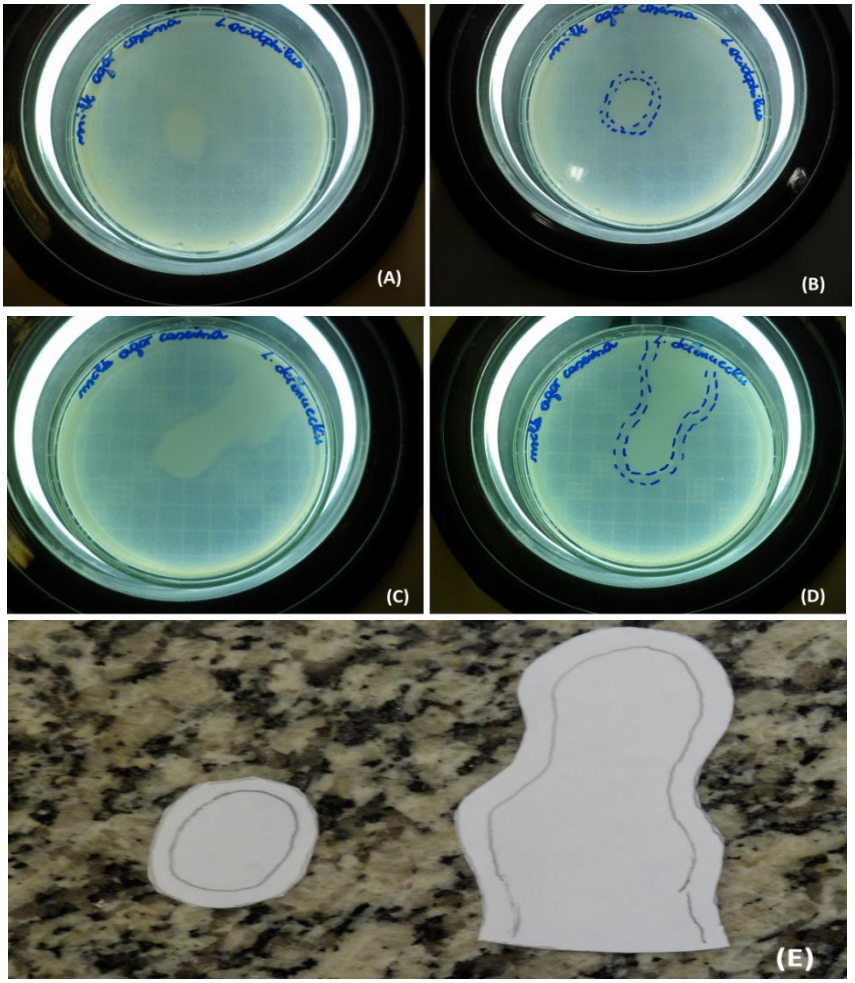

Figura 5.5: Crescimento das bactérias lácticas em meio sólido MRS caseína.
(A) e (B): Comercial 1 – *L. acidophilus*; (C) e (D) *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*; (E) Papéis referentes à área do crescimento e halo de atividade proteolítica.

A cultura de *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* apresentou a maior área total (colônia e halo), maiores área e espessura média de halo em relação à cultura comercial. Adicionalmente, a massa de células inoculada no meio foi menor que para esta cultura em relação à cultura comercial 1, gerando uma relação área do halo / concentração celular (AH/CC) cinco vezes maior, indicando que um menor número de células foi hábil de produzir a maior atividade proteolítica observada. Vale ressaltar, ainda, que *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* não é capaz de metabolizar lactose (GERMOND et al, 2003), a única fonte de carboidratos disponibilizada pelo meio contendo leite desnatado. Logo, o crescimento da cultura pode ser atribuído ao consumo de proteínas (caseína) como fonte de carbono, ratificando a intensa atividade proteolítica observada.

Tabela 5.4: Parâmetros de avaliação da atividade proteolítica das culturas lácticas

Parâmetros*	**Cultivo****	
	L. acidophilus	***L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii***
CC (mg/mL)	45,6	29,0
MPCH (colônia + halo) (g)	0,0300	0,1169
AT (colônia + halo) (cm²)	0,40	1,54
MPC (colônia) (g)	0,0162	0,0688
AH (cm²)	0,18	0,63
Relação AT/CC (cm²/g/mL)	0,009	0,05
Relação AH/CC (cm²/g/mL)	0,004	0,022
Espessura média do halo (mm)	2,76	3,68

*CC: concentração celular; MPCH: massa do papel referente à colônia + halo; AT: área total do papel; MPC: massa do papel referente à colônia; AH: área do halo;

Há diversos trabalhos na literatura que avaliaram a atividade proteolítica de diferentes bactérias lácticas. Moslehishad e colaboradores (2013) avaliaram a atividade proteolítica de espécies de bactérias lácticas, avaliando a formação de halo em meio sólido de leite desnatado a partir do crescimento da cultura ou da utilização do extrato extracelular do cultivo. Os autores também observaram ser maior a atividade proteolítica de *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, seguida de *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *S. thermophilus*. Vale ressaltar que não encontraram atividade proteolítica para o extrato extracelular obtido do crescimento com *S. thermophilus*.

Shinata e Shah (2000) também avaliaram a atividade proteolítica de diferentes linhagens de culturas lácticas conhecidas como *starters* (*S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) e culturas lácticas conhecidas como probióticas (*L. acidophilus* e *Bifidobacterium* spp.), chegando à conclusão que as primeiras apresentaram maior atividade proteolítica, destacando-se os lactobacilos. Donkor e colaboradores (2007) também avaliaram a atividade proteolítica de culturas *starters* (*S. thermophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) contra culturas probióticas (*L. acidophilus*, *Bifidobacterium* spp., e *L. casei*), obtendo as maiores atividades para as culturas *starters* (semelhantes entre si), ligeiramente menores para as espécies de *L. acidophilus* e *L. casei*, e menores para o gênero *Bifidobacterium*. Pescuma e colaboradores (2008) avaliaram a atividade proteolítica de bactérias lácticas em soro de leite, obtendo maiores valores para *S. thermophilus* e *L. acidophilus*, seguido dos *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*.

5.3.3 Curva padrão da absorvância x massa seca

A curva padrão obtida para correlação entre a massa seca de células e a densidade óptica do meio (Abs determinada em 480 nm) foi obtida para o cultivo de *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* em caldo MRS, uma vez que esta cultura foi selecionada como cultura láctica de maior atividade proteolítica (Item 5.3.2). A Figura 5.6 apresenta a correlação satisfatória (R^2 = 0,99), que foi utilizada para todos os demais capítulos em que este cultivo foi empregado como inóculo para fermentação.

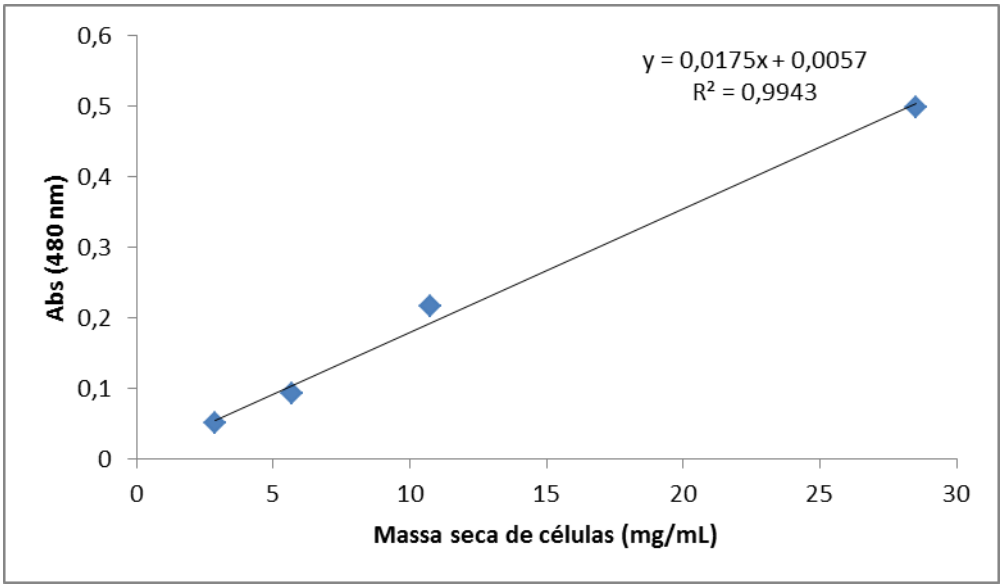

Figura 5.6: Curva padrão da Abs x massa seca para o cultivo de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* (INCQS383) em caldo MRS.

5.4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitiram concluir que:

- Nenhuma das seis culturas pré-selecionadas apresentou atividade proteolítica extracelular quando cultivadas em caldo MRS;
- As culturas mistas de origem comercial não apresentaram crescimento (*L. acidophilus, B. animalis* subsp. *lactis* e *S. thermophilus*) ou baixo crescimento (*S. thermophilus* e *L. bulgaricus*) quando cultivadas em caldo MRS caseína (modificação própria);
- As culturas de *L. casei* e *L. paracasei* promoveram intensa formação de coágulo no meio MRS caseína, indicando baixa atividade proteolítica, apesar do crescimento;
- As culturas de *L. acidophilus* e *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, foram selecionadas para o teste de atividade proteolítica em meio sólido, por terem apresentado os melhores resultados no cultivo em caldo MRS caseína;
- No teste de atividade proteolítica, a cultura de *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* apresentou maior crescimento e maior halo de degradação, mesmo partindo de menor massa inicial de células, indicativo da liberação de proteases extracelulares em maior proporção.

Tais resultados, somados aos dados revisados da literatura, motivaram a utilização da cultura de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* para continuidade deste trabalho, que contempla a fermentação láctica dos resíduos cervejeiros.

Capítulo 6

Comportamento da bactéria láctica nos resíduos cervejeiros

6.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o comportamento da linhagem de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* INCQS 383 em diferentes meios formulados a partir dos resíduos cervejeiros, em função da acidez titulável e da atividade proteolítica nos meios;
- Modelar os resultados para obtenção de superfícies de respostas referentes à acidez, à produtividade de acidez e à atividade proteolítica com base em um planejamento experimental de misturas.

6.2 MATERIAIS E MÉTODOS

6.2.1 Micro-organismo

Cultura láctica de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* INCQS 383, previamente selecionada em função de sua elevada atividade proteolítica (Capítulo 5). Condições de conservação e de cultivo para ativação já foram descritos anteriormente (Item 5.2.2).

6.2.2 Resíduos cervejeiros

Para elaboração dos meios de fermentação, foram utilizados três resíduos cervejeiros, bagaço de malte, *trub* quente e levedura residual cervejeira, cuja procedência, tratamento, caracterização e armazenamento já foram descritos no Capítulo 4.

6.2.3 Fermentação láctica dos resíduos

6.2.3.1 Planejamento experimental e formulação dos meios

O comportamento da bactéria láctica nos resíduos cervejeiros brutos foi avaliado a partir de um planejamento experimental de misturas para três componentes (CORNELL, 1990), que visou a modelagem da atividade microbiana em função da composição do meio elaborado. Tendo em vista a vasta literatura sobre a utilização de bactérias lácticas em bioprocessos da plataforma química ou de alimentos, os parâmetros da fermentação, como pH e temperatura já são bem definidos, e, portanto, não foram objeto deste estudo.

Para avaliação das respostas, foi utilizado o modelo cúbico reduzido representado pela equação:

$$\hat{y} = b_1^* x_1 + b_2^* x_2 + b_3^* x_3 + b_{12}^* x_1 x_2 + b_{13}^* x_1 x_3 + b_{23}^* x_2 x_3 + b_{123}^* x_1 x_2 x_3 \qquad \text{(Equação 6.1)}$$

Onde:

y é a resposta medida;

x_1, x_2 e x_3 são os três componentes;

b_1, b_2 e b_3 são os coeficientes de cada componente x_1, x_2 e x_3, respectivamente;

b_{12}, b_{13}, b_{23}, b_{123} são os coeficientes referentes às interações entre os componentes.

Os componentes, denotados por x_i, foram definidos como x_1 (BM), x_2 (TQ) e x_3 (LRC) e as quantidades adicionadas foram definidas em função do teor proteico bruto presente no meio, em cada formulação. As respostas quantitativas observadas foram a acidez gerada no meio (expressa em ácido láctico), a produtividade de acidez (calculada) e a atividade proteolítica do extrato bruto obtido.

Os meios foram preparados de forma a ser atingida a concentração de 4% (m/v) de proteínas totais, semelhante ao conteúdo de proteínas encontrado no leite (CHANDAN et al, 2006; WALSTRA, WOUTERS e GEURTS, 2006; TAMIME, 2006), meio no qual as bactérias lácticas apresentam bom desenvolvimento, atendendo à reconhecida característica de exigência nutricional deste grupo microbiano (PANESAR, et al, 2007; KANDLER e WEISS, 1986). Ademais, em seis artigos encontrados na literatura, nos quais os autores avaliaram a atividade proteolítica de diferentes culturas lácticas atuando em diferentes matérias-primas, os teores de proteínas nos meios de fermentação variaram entre 1 e 7% (KIRILOV et al, 2009; ROZADA-SANCHEZ et al, 2008; AGUIRRE, GARRO e GIORI, 2008; CAGNO et al, 2002; CHIN e INGLEDEW, 1994; ABASIEKONG, 1991), corroborando para a escolha da concentração de 4%, como valor médio,

A Tabela 6.1 apresenta a formulação dos meios de cada experimento levando em consideração o teor proteico de cada resíduo (resultado discutido no Capítulo 4), em 200 mL de meio reacional, volume utilizado em cada ensaio. A sigla PMFL foi utilizada para denotar "planejamento de misturas para fermentação láctica". Note-se que todos os meios correspondentes a qualquer um dos experimentos apresentaram teor fixo de proteínas, variando apenas a fonte destas (resíduo ou mistura de resíduos). Além do conteúdo proteico, a composição de cada meio foi calculada em função da composição dos resíduos cervejeiros (determinada no Capítulo 4) e da massa de resíduo adicionada e é indicada na Tabela 6.2.

Os experimentos E1 PMFL, E2 PMFL e E3 PMFL correspondem aos meios formulados com apenas um tipo de resíduo como fonte proteica, bagaço de malte (BM), *trub* quente (TQ) e levedura residual cervejeira (LRC), respectivamente. Os experimentos E4 PMFL, E5 PMFL e E6 PMFL representam os meios formulados com 2 resíduos diferentes, onde cada um fornece 50% do teor de proteínas. O experimento de E7 PMFL apresenta a interação entre os três resíduos, no qual cada resíduo fornece 33% do teor proteico total.

Tabela 6.1: Formulação dos meios dos experimentos do planejamento experimental de mistura, para concentração final de 4% de proteínas em 200 mL de meio

Experimento*	BM (x_1)		TQ (x_2)		LRC (x_3)	
	% P**	Massa (g)	% P**	Massa (g)	% P**	Massa (g)
E1 PMFL	100	29,6	0	-	0	-
E2 PMFL	0	-	100	16,4	0	-
E3 PMFL	0	-	0	-	100	15,2
E4 PMFL	50	14,8	50	8,4	0	-
E5 PMFL	50	14,8	0	-	50	7,6
E6 PMFL	0	-	50	8,4	50	7,6
E7 PMFL	33	10	33	5,6	33	5,0

*PMFL – Planejamento de misturas para fermentação láctica;
**%P – percentual de participação no fornecimento de proteínas ao meio.

Tabela 6.2: Composição dos meios do planejamento experimental de misturas calculada em função da composição determinada para cada resíduo

Composição*	Experimentos						
	E1 PMFL	E2 PMFL	E3 PMFL	E4 PMFL	E5 PMFL	E6 PMFL	E7 PMFL
Cinzas (%)	0,56	0,16	0,45	0,37	0,51	0,31	0,39
TOC (%)	7,74	4,14	3,47	5,99	5,60	3,85	5,17
ARs (%)	0,10	1,64	0,10	0,89	0,10	0,89	0,63
Ns (%)	0,05	0,01	0,19	0,03	0,12	0,10	0,09
Ps (%)	0,34	0,07	1,11	0,21	0,73	0,59	0,51
FANs (mg/100 mL)	5,33	1,80	31,08	3,59	18,21	16,47	12,64

*TOC: carbono orgânico total; ARs: açúcar redutor solúvel; Ns: nitrogênio solúvel; Ps: proteína bruta solúvel; FANs: amino ácidos (*free amino nitrogen*) da fração solúvel, expressos em glicina.

6.2.3.2 Fermentação e determinações analíticas

As fermentações com os resíduos industriais foram realizadas em escala de bancada, utilizando frascos Erlenmeyers de vidro de 500 mL de capacidade, devidamente tampados com material hidrofóbico (Figura 6.1). Os meios formulados foram submetidos à autoclavagem (0,5 atm., 111°C/20 min.) e o valor de pH aferido para 6,5 com NaOH 1N, valor definido pela coleção de culturas (INCQS) para ativação e propagação desta cultura láctica, e próximo, também, ao pH do leite, cujo pH médio é 6,6 (EMBRAPA, S/D). Conforme ensaios anteriores, os meios foram testados quanto à sua esterilidade (Item 5.2.2).

Para os ensaios de fermentação, os meios foram inoculados, assepticamente, com 10% v/v da cultura láctica na fase exponencial do crescimento em meio MRS. Neste ponto, foi determinada uma absorbância (480 nm) de 0,394, correspondente à massa seca de 22,2

mg/mL, conforme correlação indicada na Figura 5.6. Os cultivos foram incubados, em *shaker* rotacional (Cientec CT712RN), com a temperatura controlada em 37°C e agitação em 100 rpm, apenas para manter a homogeneização do meio (Figura 6.1).

Figura 6.1: Frascos Erlenmeyers para fermentação em *shaker* rotacional.

Nos tempos zero, 3, 6, 12, 18 e 24 horas, amostras foram retiradas para determinação da acidez titulável com NaOH 0,1 M, utilizando fenolftaleína como indicador, sendo os resultados expressos em ácido láctico. Em tempos estratégicos de 6, 12 e 18 horas, foram retiradas amostras, cujas frações sólida e líquida foram separadas por centrifugação sob refrigeração (centrífuga HERMILE, Z400, aproximadamente 2500 g, 15 min., 4°C). Da fração líquida obtida, denominada por extrato bruto, foram determinados os valores da atividade proteolítica pelo método da azocaseína (CHARNEY e TOMARELLI, 1947). Adicionalmente, foi determinado o pH (medição direta em pHmetro PHTEK, modelo PHS-3B) para o tempo final de fermentação.

Os resultados obtidos, a acidez (expressa em ácido láctico), a produtividade de acidez (Q_P) e a atividade proteolítica (A_P), foram avaliados estatisticamente através da construção de modelos matemáticos (Equação 6.1) e de superfícies de resposta, de análises de variância (ANOVA) e do teste de Tukey, de comparação de médias, quando necessário. De forma a facilitar a explanação dos resultados e discussão, os mesmos foram divididos em duas subseções, Acidez e Atividade Proteolítica, na seção seguinte.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.3.1 Acidez

Foram obtidos os perfis cinéticos da evolução da acidez titulável (expressa em concentração de ácido láctico) para os sete experimentos do planejamento de misturas, demonstrados na Figura 6.2, a seguir.

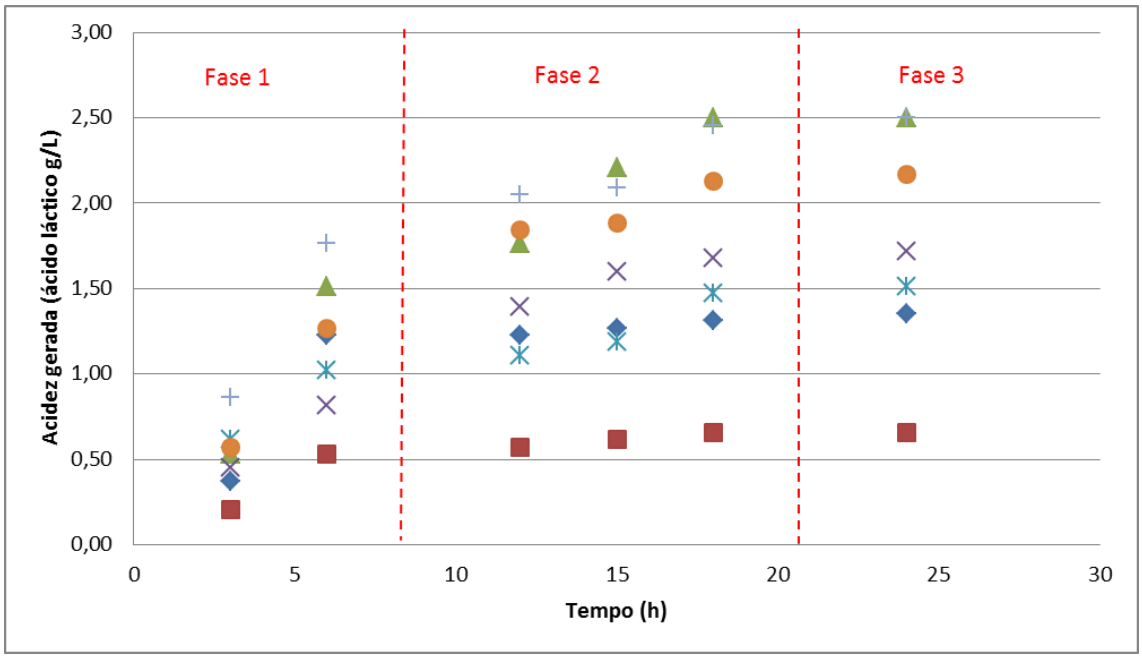

Figura 6.2: Perfis de evolução da acidez (A) e do pH (B) durante a fermentação láctica dos meios elaborados a partir dos resíduos cervejeiros

(◆ E1 PMFL (BM) ■ E2 PMFL (TQ) ▲ E3 PMFL (LRC) × E4 PMFL (BM+TQ) ✳ E5 PMFL (BM+LRC) ● E6 PMFL (TQ+LRC) + E7 PMFL (BM+TQ+LRC))

Os perfis obtidos representam a atividade das bactérias lácticas que liberam ácido láctico como produto do metabolismo primário, associado ao crescimento microbiano, promovendo elevação da acidez do meio (MARTINEZ et al, 2013; TEUSINK, BACHMANN e MOLENAAR, 2011). Para um estudo inicial, de avaliação do potencial dos resíduos para a atividade das bactérias lácticas, o uso da acidez, expressa em ácido láctico, é apropriado, uma vez que a espécie utilizada, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* é homofermentativa obrigatória, quando mais de 85% dos produtos gerados correspondem ao ácido láctico (GERMOND et al, 2003), podendo este produto ser associado ao crescimento celular.

É possível observar na Figura 6.2 que, para todas as formulações de meio, a fase *lag* para adaptação ao novo meio não foi observada ou foi muito curta, não sendo percebida no

intervalo de 3 horas. A cultura de bactéria láctica para inoculação foi proveniente do cultivo em crescimento exponencial em um meio rico (meio MRS para lactobacilos). Tal resultado indica que os resíduos cervejeiros apresentam potencial para elaboração de meios para cultivo destes micro-organismos, reconhecidamente exigentes de fatores nutricionais (PANESAR, et al, 2007; KANDLER e WEISS, 1986).

Para a maioria dos ensaios, observa-se que é possível dividir o intervalo de fermentação em três fases, conforme representado na Figura 6.2. A Fase 1, até o ponto 6 horas aproximadamente, com intensa atividade microbiana, caracterizada pela acentuada inclinação dos pontos indicadores de acidez. A Fase 2, onde a atividade das bactérias é ligeiramente diminuída, em relação à Fase 1, indicando uma desaceleração da atividade microbiana; e a Fase 3, entre os tempos 18 e 24 horas, que pode caracterizar a fase estacionária devido ao platô observado. Esta última fase pode ter sido rapidamente atingida por diversos fatores, inclusive devido à rápida atividade microbiana e pela rápida escassez de fontes disponíveis de carbono e energia.

Foram calculadas as taxas médias de formação de produto (acidez expressa em ácido láctico) para as fases de atividade microbiana delimitadas e identificadas por 1 e 2, nos perfis da fermentação indicados na Figura 6.2. Os resultados são apresentados na Tabela 6.3 e na Figura 6.3.

Tabela 6.3: Taxas médias de formação de produto (acidez expressa em ácido láctico) para as Fases 1 e 2 da atividade microbiana

Experimento*	**Taxa média de formação de produto (g/L.h)**	
	Fase 1* **	**Fase 2*** **
E1 PMFL (BM)	0,188	0,006
E2 PMFL (TQ)	0,085	0,011
E3 PMFL (LRC)	0,238	0,034
E4 PMFL (BM + TQ)	0,139	0,020
E5 PMFL (BM + LRC)	0,178	0,026
E6 PMFL (TQ + LRC)	0,208	0,016
E7 PMFL (BM + TQ + LRC)	0,292	0,022

*PMFL: planejamento de misturas para fermentação láctica; BM: bagaço de malte; TQ: *trub* quente; LRC: levedura residual cervejeira;

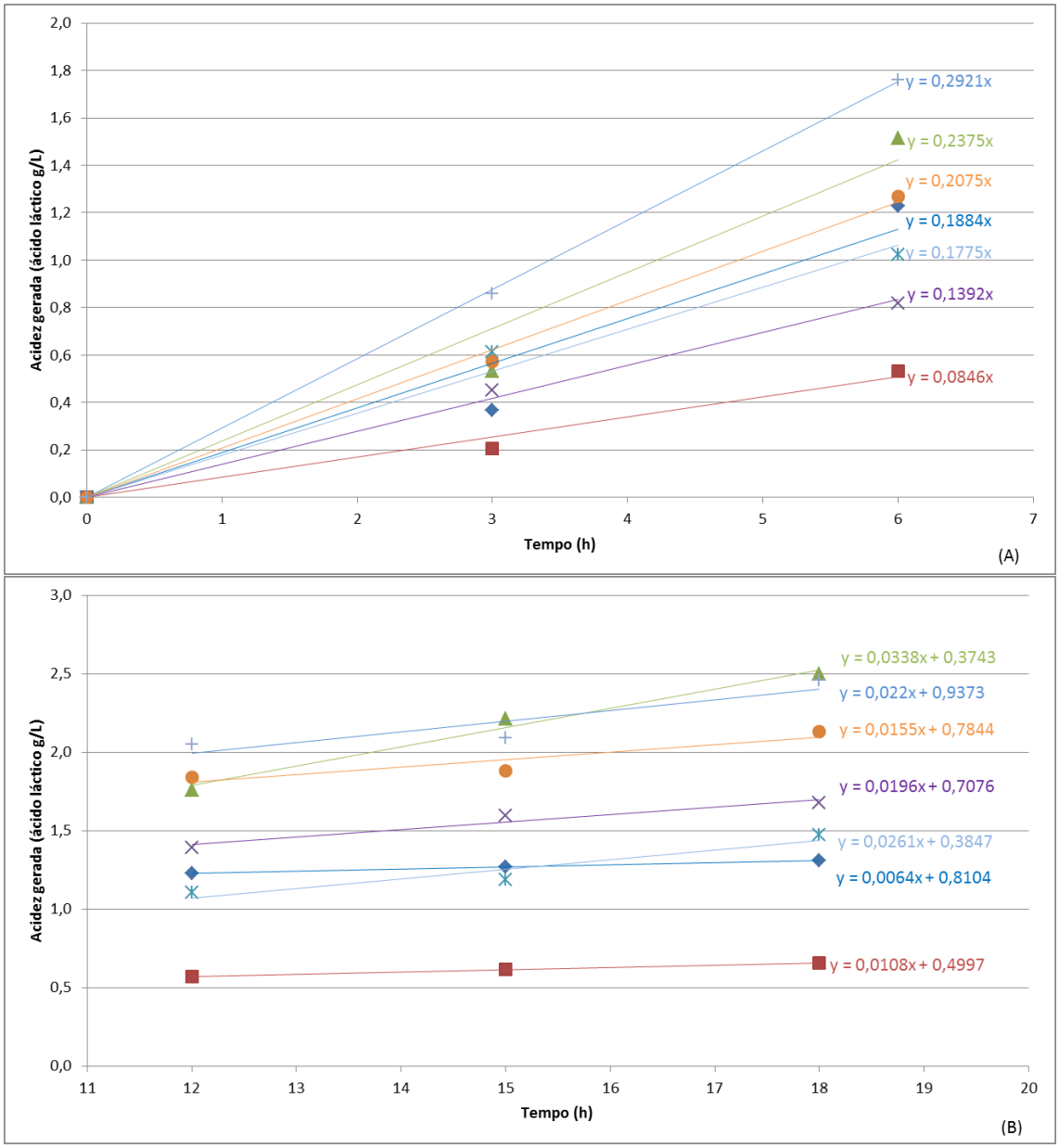

Figura 6.3: Taxas médias de formação de produto. (A) Fase 1, de 3 a 6 horas; (B) Fase 2, de 12 a 18 horas. A taxa de formação de produto corresponde ao coeficiente linear de cada reta

(◆ E1 PMFL (BM) ■ E2 PMFL (TQ) ▲ E3 PMFL (LRC) × E4 PMFL (BM+TQ) ✳ E5 PMFL (BM+LRC) ● E6 PMFL (TQ+LRC) + E7 PMFL (BM+TQ+LRC))

A Figura 6.3 demonstra que as retas de maiores inclinações, indicativas de maior taxa média de formação de produto, são correspondentes aos experimentos E3 PMFL e E7 PMFL, enquanto que a menor inclinação foi registrada para o experimento E2 PMFL. Nota-se, ainda, que da Fase 1 para a Fase 2 ocorre redução das taxas médias de formação de produto para todas as formulações de meio, ratificando a delimitação destas fases de atividade microbiana. A diminuição menos intensa, de 7 vezes, foi observada para o experimento E3 PMFL, seguida dos experimentos E6 PMFL e E7 PMFL, 13 vezes, chegando a 30 vezes para o experimento E1 PMFL.

As taxas médias de formação de produto (acidez) podem ser analisadas segundo o modelo de Ludeking-Piret, expresso na Equação 6.2, que propõe a relação entre a formação de produto e a taxa de crescimento celular por uma constante (α), ou com a concentração celular por uma segunda constante (β). Juntamente com as fases de atividade definidas na Figura 6.2, as taxas médias de geração de ácido láctico confirmam que este é um produto associado ao crescimento, ou seja, um produto do metabolismo primário. Pode-se propor, então, a maior relevância do coeficiente α em relação ao coeficiente β da Equação 6.2.

$$\frac{dP}{dt} = \alpha\left(\frac{dX}{dt}\right) + \beta X \qquad \text{(Equação 6.2)}$$

Onde:

$\frac{dP}{dt}$: taxa de formação de produto;

$\frac{dX}{dt}$: taxa de crescimento celular;

X: concentração celular;

α: constante associada ao crescimento celular;

β: constante associada à concentração celular.

Analisando os perfis de acidez obtidos (Figura 6.2), nota-se que os experimentos E3 PMFL (LRC) e E7 PMFL (BM + TQ + LRC) apresentaram o maior valor final de acidez, enquanto que o experimento E2 PMFL (TQ) levou à menor geração de acidez no meio durante a atividade da cultura láctica. Para avaliar as diferenças estatísticas entre os resultados obtidos para a acidez foi realizado o teste de Tukey de comparação de médias, ao nível de 5% de significância (Tabela 6.4), em função do tempo de fermentação e da formulação do meio (neste caso, para o tempo 24 horas). Desta maneira, é possível determinar o momento ideal de interromper o processo fermentativo, uma vez que nas horas posteriores não haverá acréscimo significativo de acidez, bem como avaliar se houve diferença dos resultados em função da variação da formulação dos meios, ou seja, do uso dos resíduos.

Tabela 6.4: Teste de Tukey para acidez em função do tempo de fermentação e da formulação dos meios

Experimentos*	Acidez** (ácido láctico g/L)					
	Tempo (h)					
	3	6	12	15	18	24
E1 PMFL (BM)	$0,37^{a}$	$1,23^{b}$	$1,23^{b}$	$1,27^{b}$	$1,31^{b}$	$1,35^{b,1}$
E2 PMFL (TQ)	$0,20^{a}$	$0,53^{b}$	$0,57^{b}$	$0,61^{b}$	$0,66^{b}$	$0,66^{b,2}$
E3 PMFL (LRC)	$0,53^{a}$	$1,52^{b}$	$1,76^{b}$	$2,21^{c}$	$2,50^{d}$	$2,50^{d,3}$
E4 PMFL (BM + TQ)	$0,45^{a}$	$0,82^{b}$	$1,39^{c}$	$1,6^{c}$	$1,68^{d}$	$1,72^{d,4}$
E5 PMFL (BM + LRC)	$0,61^{a}$	$1,02^{b}$	$1,11^{b}$	$1,19^{b}$	$1,47^{c}$	$1,52^{c,4}$
E6 PMFL (TQ + LRC)	$0,57^{a}$	$1,27^{b}$	$1,84^{c}$	$1,88^{c}$	$2,13^{d}$	$2,17^{d,5}$
E7 PMFL (BM + TQ + LRC)	$0,86^{a}$	$1,76^{b}$	$2,05^{c}$	$2,09^{c}$	$2,46^{d}$	$2,50^{d,3}$

*PMFL: planejamento de misturas para fermentação láctica; BM: bagaço de malte; TQ: *trub* quente; LRC: levedura residual cervejeira;
**Letras sobrescritas iguais na mesma linha correspondem a valores estatisticamente iguais, para 5% de significância;
**Números sobrescritos iguais na última coluna (tempo 24h) correspondem a valores estatisticamente iguais, para 5% de significância.

Conforme observado, o teste de Tukey para acidez (Tabela 6.4) indica que para os meios E1 PMFL e E2 PMFL o valor significativo de acidez já é atingido no intervalo de 6 horas de fermentação, indicado pelo índice 'b' sobrescrito para os valores de acidez a partir deste tempo. Para os demais experimentos, este valor máximo é atingido a partir das 18 horas, como indicado pelo mesmo índice nos tempos 18 e 24h, 'c' ou 'd' a depender do experimento analisado.

As diferenças estatísticas observadas entre os resultados de acidez das formulações de meio, notada pela quantidade de índices numéricos utilizados na última coluna da Tabela 6.4 (7 experimentos e índices de 1 a 5), demonstram o efeito da fração molar de cada resíduo sobre a composição do meio e, consequentemente, sobre as respostas observadas.

A Tabela 6.5 apresenta os valores finais de pH determinados para cada ensaio. A redução do pH resulta em diminuição da atividade das bactérias lácticas, por isso, na prática industrial de produção de ácido láctico são utilizados agentes neutralizantes (GHAFFAR et al, 2014; MARTINEZ et al, 2013; LIMA et al, 2001a). Nesta etapa do presente trabalho, o objetivo foi de avaliar o comportamento da bactéria láctica nos resíduos cervejeiros brutos, delineando seu perfil de atividade, de forma que não houve controle do pH do meio reacional. Este fator pode ter colaborado para que a fase estacionária (Fase 3, definida anteriormente) tenha sido atingida precocemente nos ensaios.

Tabela 6.5: Valores de pH ao final da fermentação láctica (24 h) para os diferentes meios do planejamento de misturas

Experimentos*	pH
E1 PMFL (BM)	5,2
E2 PMFL (TQ)	5,5
E3 PMFL (LRC)	5,4
E4 PMFL (BM + TQ)	5,7
E5 PMFL (BM + LRC)	5,7
E6 PMFL (TQ + LRC)	4,9
E7 PMFL (BM + TQ + LRC)	5,0

*PMFL: planejamento de misturas para fermentação láctica; BM: bagaço de malte; TQ: *trub* quente; LRC: levedura residual cervejeira.

Observa-se que os meios contendo LRC e sem *trub* em sua composição apresentaram as menores quedas de pH (Tabela 6.5). Sabe-se que o resíduo LRC apresenta o maior conteúdo de aminoácidos (FAN) em sua composição (Tabela 4.6). A escassez de fontes de açúcares fermentescíveis promove o uso das cadeias carbônicas destes aminoácidos para atividade microbiana e reprodução celular. Tendo em vista a elevada relação C/N na composição de uma célula, além da geração de um ácido orgânico como produto do metabolismo celular, o consumo de carbono é maior que o de nitrogênio, de forma que ocorre liberação de amina no meio reacional. Este composto, quando protonado, resulta na formação de amônia, que apresenta efeito neutralizante sobre o pH do meio. Esta hipótese é ratificada pela comparação dos resultados obtidos para os experimentos E3 PMFL e E7 PMFL, que obtiveram os maiores (e iguais entre si) valores de acidez, embora o pH tenha se mantido mais elevado para o primeiro meio, cuja composição apresentou maior teor de LRC.

Observando os resultados de taxa média de formação de produto (já discutidos e apresentados na Tabela 6.3) e do pH final (Tabela 6.5), nota-se que as maiores reduções de taxa de formação de produto entre a Fase 1 e a Fase 2 são observadas para os experimentos que apresentaram maior redução do pH (E1 PMFL, E6 PMFL e E7 PMFL), com exceção dos meios contendo LRC (E3 PMFL e E5 PMFL). Isto corrobora para as duas hipóteses já citadas, de que a queda do pH desfavoreceu a atividade microbiana e de que o consumo de aminoácidos disponibilizados pelo resíduo LRC pode ter promovido tamponamento do meio reacional.

Adicionalmente, foram calculados os valores de produtividade de acidez para cada tempo, com resultados indicados na Figura 6.4. O teste de Tukey também foi realizado (Tabela 6.6) e indicou que os maiores valores desta resposta foram observados já no tempo 3 horas, indicados pelos índices 'a' na primeira coluna da Tabela 6.6, com exceção do experimento E1 PMFL e E3 PMFL, cujas produtividades máximas foram determinadas em 6 horas de fermentação. No caso do experimento E7 PMFL, apesar da ligeira diferença visual observada no gráfico (Figura 6.4), os valores são 0,287 e 0,293 para os tempos 3 e 6 horas, respectivamente (Tabela 6.6), que se arredondados, serão iguais a 0,29. Este resultado ratifica as taxas de formação de produto (Tabela 6.3), que foram maiores para o intervalo de tempo até 6 h de atividade microbiana, correspondente à Fase 1 previamente definida.

É possível verificar, ainda, que para a maioria dos experimentos, após a produtividade máxima ser atingida, observou-se uma redução, praticamente linear, em tempos posteriores (Figura 6.4), com exceção dos experimentos E2 PMFL e E4 PMFL, cujos valores de produtividade permaneceram estatisticamente iguais até os tempos 12 e 15 horas, respectivamente. Este fato provavelmente foi decorrente da baixa disponibilidade de fontes de açúcares fermentescíveis, havendo maior consumo da quantidade disponível nas primeiras horas de fermentação.

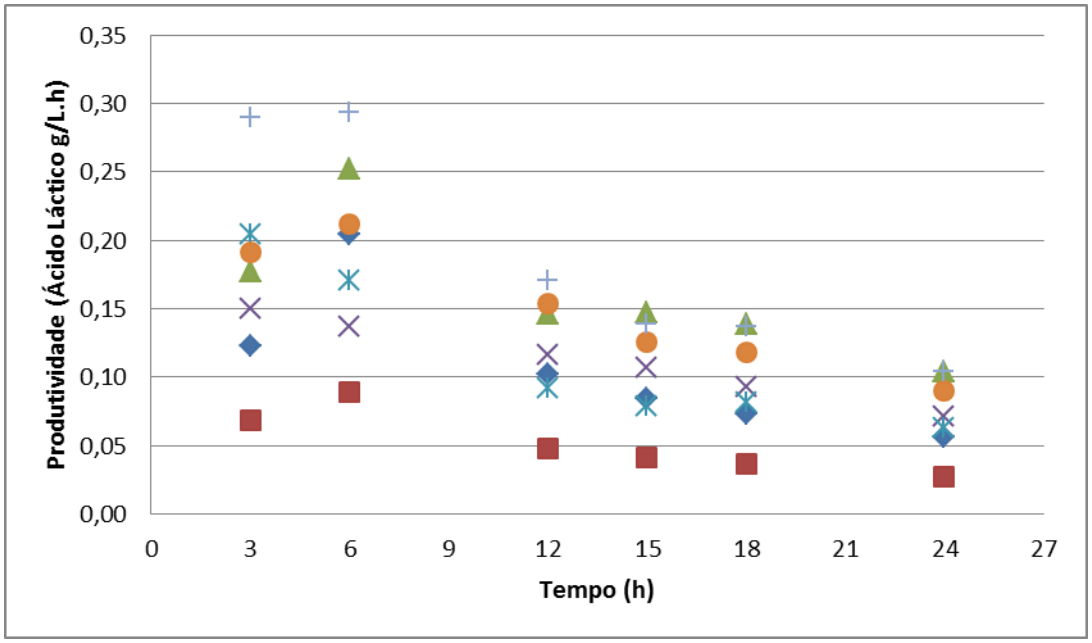

Figura 6.4: Produtividade (expressa em ácido láctico) em função do tempo de fermentação

(◆ E1 PMFL (BM) ■ E2 PMFL (TQ) ▲ E3 PMFL (LRC) × E4 PMFL (BM+TQ) ✳ E5 PMFL (BM+LRC) ● E6 PMFL (TQ+LRC) + E7 PMFL (BM+TQ+LRC))

Tabela 6.6: Teste de Tukey para produtividade de acidez em função do tempo de fermentação

Experimentos*	Produtividade de Acidez** (ácido láctico g/L.h)					
	Tempo (h)					
	3	6	12	15	18	24
E1 PMFL (BM)	$0,12^{b}$	$0,20^{a,3}$	$0,10^{b,c}$	$0,08^{b,c,d}$	$0,07^{c,d}$	$0,06^{d,4}$
E2 PMFL (TQ)	$0,07^{a,b}$	$0,09^{a,5}$	$0,05^{a,b}$	$0,04^{b}$	$0,04^{b}$	$0,03^{b,5}$
E3 PMFL (LRC)	$0,18^{b}$	$0,25^{a,1,2}$	$0,15^{b,c}$	$0,15^{b,c}$	$0,14^{b,c}$	$0,10^{c,1}$
E4 PMFL (BM + TQ)	$0,15^{a}$	$0,14^{a,b,4}$	$0,12^{a,b}$	$0,11^{a,b,c}$	$0,09^{b,c}$	$0,07^{c,3}$
E5 PMFL (BM + LRC)	$0,20^{a}$	$0,17^{a,3,4}$	$0,09^{b}$	$0,08^{b}$	$0,08^{b}$	$0,06^{b,3,4}$
E6 PMFL (TQ + LRC)	$0,19^{a,b}$	$0,21^{a,2,3}$	$0,15^{b,c}$	$0,13^{c,d}$	$0,12^{c,d}$	$0,09^{d,2}$
E7 PMFL (BM + TQ + LRC)	$0,29^{a}$	$0,29^{a,1}$	$0,17^{b}$	$0,14^{b,c}$	$0,14^{b,c}$	$0,10^{c,1}$

* PMFL: planejamento de misturas para fermentação láctica; BM: bagaço de malte; TQ: *trub* quente; LRC: levedura residual cervejeira;

**Letras sobrescritas iguais na mesma linha correspondem a valores estatisticamente iguais, para 5% de significância;

**Números sobrescritos iguais na segunda e na última coluna (tempos 6h e 24h, respectivamente) correspondem a valores estatisticamente iguais, para 5% de significância.

O experimento E7 PMFL, com os três resíduos presentes, apresentou a maior produtividade durante todo o intervalo estudado, sendo, contudo, igual aos valores obtidos para o experimento E3 PMFL, contendo apenas LRC, a partir do tempo 15 horas, como pode ser observado pelo mesmo índice '1' sobrescrito na última coluna da Tabela 6.6. Tal resultado também está de acordo com os valores finais de acidez (24 horas), que foram maiores para estas duas formulações (Tabela 6.4).

A Tabela 6.7 apresenta os valores de produtividade média final para as 24 h de fermentação. Os experimentos E3 PMFL e E7 PMFL apresentaram os maiores valores para esta resposta. O experimento E2 PMFL (contendo apenas *trub* em sua composição) apresentou a menor produtividade média e o menor valor de acidez, embora seu valor máximo tenha sido atingido no menor tempo (Tabela 6.4).

Tabela 6.7: Produtividade final (expressa em ácido láctico) para os diferentes meios do planejamento de misturas

Experimentos*	$Q_{P\ final}$ (g/L.h)
E1 PMFL (BM)	0,06
E2 PMFL (TQ)	0,03
E3 PMFL (LRC)	0,10
E4 PMFL (BM + TQ)	0,07
E5 PMFL (BM + LRC)	0,06
E6 PMFL (TQ + LRC)	0,09
E7 PMFL (BM + TQ + LRC)	0,10

*PMFL: planejamento de misturas para fermentação láctica; BM: bagaço de malte; TQ: *trub* quente; LRC: levedura residual cervejeira.

Análise estatística dos resultados

A escolha de fatores e respostas quantitativos no desenvolvimento do planejamento de misturas permite a construção de um modelo para as respostas (y), em função das frações molares de cada componente como variáveis independentes (x_1, x_2 e x_3), bem como da interação entre tais componentes (x_1x_2, x_1x_3, x_2x_3 e $x_1x_2x_3$). Foi construído um modelo para os valores finais de acidez (expressa em ácido láctico g/L) e, adicionalmente, para a resposta calculada (a produtividade para o tempo 6 horas, expressa em ácido láctico g/L.h). Os modelos são apresentados na Tabela 6.8. As respostas medidas experimentalmente e as previsões de cada modelo são dispostas na Tabela 6.9.

Tabela 6.8: Modelos matemáticos para as respostas Acidez e Produtividade para o primeiro planejamento experimental – Planejamento de Misturas

Modelo	Parâmetros
$Acidez = 1{,}4x_1 + 0{,}7x_2 + 2{,}5x_3 + 2{,}7x_1x_2 - 1{,}8x_1x_3 + 2{,}5x_2x_3 + 16{,}5x_1x_2x_3$	x_1: BM x_2: TQ x_3: LRC x_{ij} e x_{ijk}: interações*
$Produtividade = 0{,}20x_1 + 0{,}09x_2 + 0{,}25x_3 - 0{,}04x_1x_2 - 0{,}23x_1x_3 + 0{,}16x_2x_3 + 3{,}35x_1x_2x_3$	

*Com i, j e k variando de 1 a 3.

Tabela 6.9: Valores de acidez e produtividade medidos experimentalmente e seus respectivos correspondentes previstos pelos modelos

Experimento*	Acidez (ácido láctico g/L) – 24h	
	Respostas (Medidas)	Previsão (Modelo)
E1 PMFL	1,40	1,40
E2 PMFL	0,70	0,70
E3 PMFL	2,50	2,50
E4 PMFL	1,72	1,72
E5 PMFL	1,52	1,52
E6 PMFL	2,17	2,17
E7 PMFL	2,50	2,50
Experimento*	**Produtividade (ácido láctico g/L.h) – 6h**	
	Respostas (Medidas)	**Previsão (Modelo)**
E1 PMFL	0,20	0,21
E2 PMFL	0,09	0,09
E3 PMFL	0,25	0,25
E4 PMFL	0,14	0,14
E5 PMFL	0,17	0,17
E6 PMFL	0,21	0,21
E7 PMFL	0,29	0,29

*PMFL – Planejamento de misturas para fermentação láctica

Por serem modelos de misturas, suas variáveis (componentes) não são independentes, tendo em vista que a fração molar total deverá ser sempre 1. Quando uma variável é alterada, pelo menos uma das outras duas também deverá ser, de forma a cumprir este requisito. Deste modo, não é possível afirmar que a magnitude do valor de cada coeficiente represente seguramente a sua influência sobre a resposta medida, contudo, é possível observar que os sinais, positivo (+) ou negativo (-), indicam aumento ou redução dos valores esperados, respectivamente.

Observa-se que os modelos calculados apresentam bom ajuste, tanto para acidez quanto para a produtividade, da área estudada, uma vez que os valores previstos são semelhantes aos valores determinados experimentalmente. A partir dos modelos gerados, foi possível construir superfícies de respostas, indicadas nas Figuras 6.5 e 6.6.

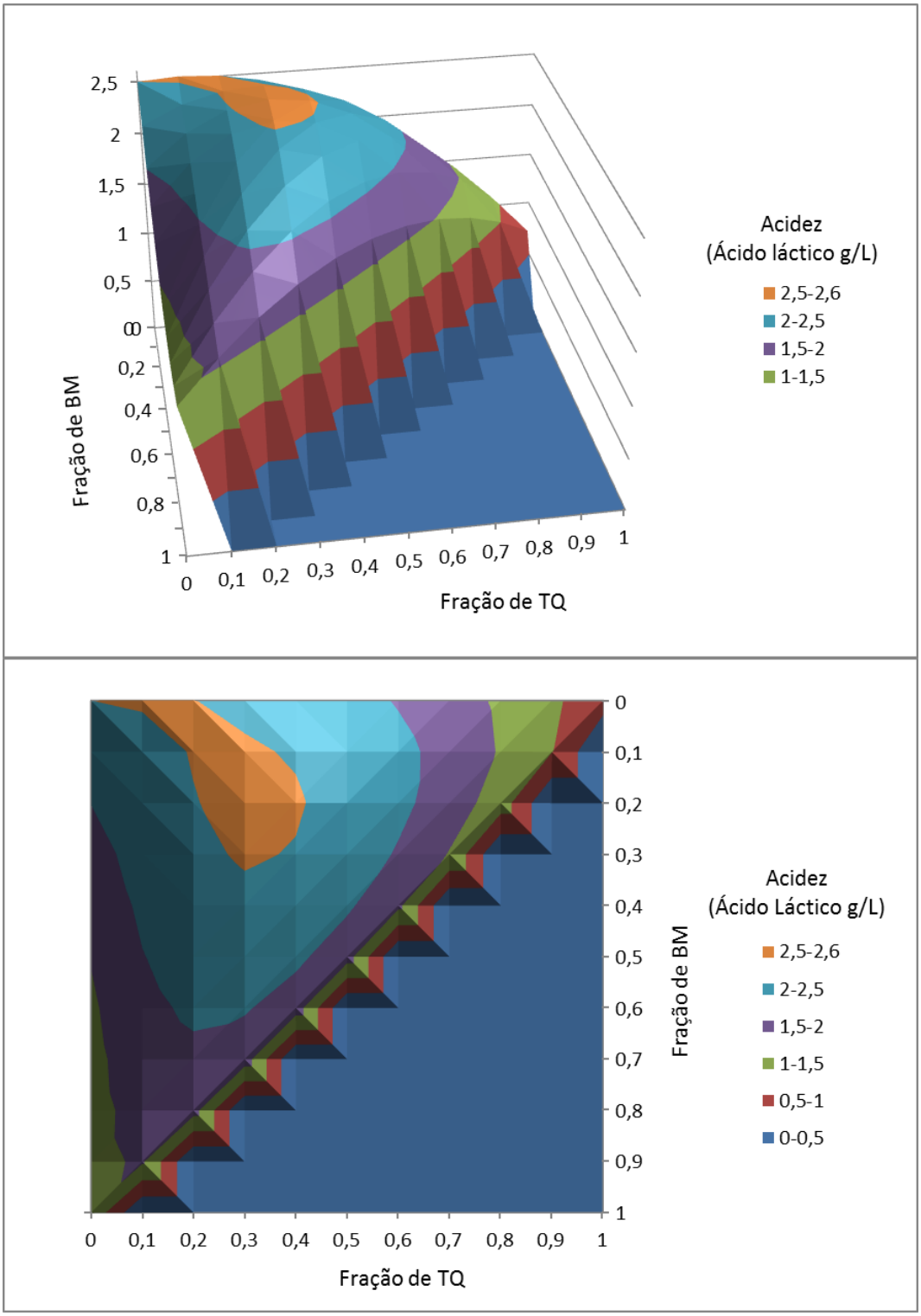

Figura 6.5: Superfície de resposta para a acidez (expressa em ácido láctico) do extrato fermentado bruto.

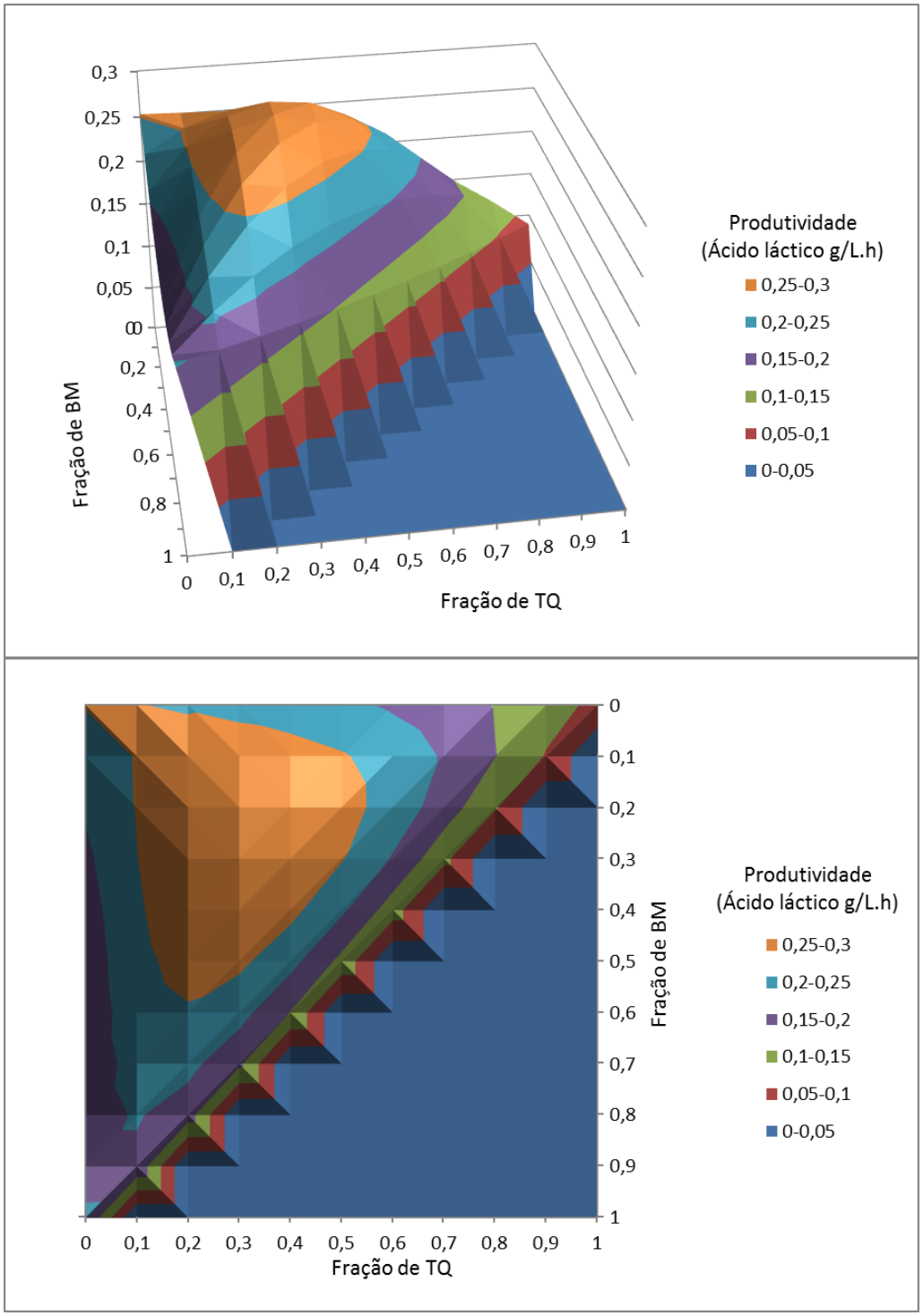

Figura 6.6: Superfície de resposta para a produtividade (expressa em ácido láctico) do extrato fermentado bruto.

De um modo geral, a partir dos resultados experimentais obtidos, é possível observar que a presença de LRC teve efeito positivo sobre a geração de acidez no meio e o aumento da produtividade, conforme observado nos experimentos E3 PMFL, E5 PMFL, E6 PMFL e E7 PMFL, que contêm este resíduo e estão sempre entre os maiores resultados determinados

para estas respostas (Tabelas 6.4 e 6.6). Esta tendência é corroborada pelo sinal (+) do coeficiente b_3, no modelo calculado (Tabela 6.8) e pela observação das superfícies de resposta construídas (Figuras 6.5 e 6.6).

Observando as superfícies de resposta para acidez (Figura 6.5) e para a produtividade (Figura 6.6), nota-se a grande semelhança entre os perfis traçados. Estas superfícies indicam que as regiões de máximo de acidez e produtividade (região de cor laranja) estão localizadas mais à parte superior e esquerda, correspondentes aos mais baixos valores de TQ e BM (eixos escolhidos para representação gráfica). Consequentemente, como as variáveis são dependentes entre si, isto acarreta que a presença de LRC é importante para manter os resultados esperados na faixa ótima. Observa-se ainda, que as melhores respostas podem ser alcançadas pela combinação dos três resíduos (como no experimento E7 PMFL), ou pelo uso de LRC isoladamente (como no experimento E3 PMFL).

Pelo contrário, o *trub* quente, quando componente único de formulação do meio, apresentou os menores resultados para as respostas medidas (Tabelas 6.4 e 6.6). Conforme já discutido no Capítulo 4, o *trub* quente apresentou o menor teor de proteínas (0,88%), aminoácidos (0,22 mg/g) e minerais (2%) na fração solúvel, embora tenha em sua composição elevado teor de nitrogênio total (8%) e carbono orgânico total (50%). Dessa maneira, os meios formulados contendo este resíduo apresentaram ligeira redução de componentes solúveis e disponíveis em relação aos demais, fato já observado na Tabela 6.2. Tal fator pode ter contribuído para a baixa atividade microbiana.

Adicionalmente, vale ressaltar que o *trub* contém uma série de resinas provenientes do lúpulo. Parte da fração de α-ácidos do lúpulo, responsável pelo característico amargor da cerveja, é isomerizada e solubilizada no mosto cervejeiro durante a cocção. Contudo, a eficiência desta isomerização é baixa, em torno de 30%, de forma que grande parte desta fração se insolubiliza e precipita junto ao *trub* quente. Conhecidamente, estes compostos apresentam características bacteriostáticas (HORNSEY, 1999; HAUNOLD e NICKERSON, 1993), que podem ter tido efeito inibitório sobre a atividade dos lactobacilos durante a fermentação láctica dos meios que contém este resíduo em excesso.

Contudo, se o *trub* for adicionado de outros componentes, seu efeito pode ser positivo sobre a geração de acidez no meio, como observado pelos coeficientes com sinal positivo das interações x_1x_2 (BM e TQ), x_2x_3 (TQ e LRC) e $x_1x_2x_3$ (BM, TQ e LRC) do modelo

referente a esta resposta (Tabela 6.8). Observando as superfícies de resposta (Figuras 6.5 e 6.6), nota-se que para até certo valor de fração molar do *trub* quente ainda pode ser obtido o máximo de acidez e produtividade, contudo, quando aumentado em relação aos demais resíduos, as respostas diminuem, ratificando a hipótese de que o excesso de *trub* teve efeito contrário à produção de acidez no meio.

A utilização dos três resíduos para produção de ácido láctico torna-se mais atraente que a utilização apenas de LRC, uma vez que este último já apresenta destinos mais nobres, como obtenção de extratos de levedura, suplementos vitamínicos e minerais, e, como será visto adiante, potencial para obtenção de extratos proteolíticos por fermentação. Ademais, o bagaço de malte e a levedura residual têm em sua composição maior teor de proteínas e aminoácidos livres (discutido no Capítulo 4), além de uma série de vitaminas (PRIEST e STEWART, 2006) que podem ter tido efeito como fator de crescimento microbiano. Já a contribuição do *trub* quente pode estar associada à presença de maior teor de açúcares redutores em relação aos demais resíduos.

Adicionalmente, as regiões mais planas das superfícies (região de cor laranja, onde os máximos foram calculados) conferem maior segurança e robustez para realização dos trabalhos experimentais, além de que, experimentalmente, a maior produtividade de acidez foi obtida em menor tempo (3 horas) para o experimento E7 PMFL (Tabela 6.6), que combina os três resíduos.

Diversos autores têm proposto a utilização de resíduos industriais como fontes de carbono e/ou nitrogênio para a obtenção de ácido láctico por fermentação (WANG, TASHIRO e SONOMOTO, 2014; ABDEL-RAHMAN, TASHIRO e SONOMOTO, 2011; GAO, MA e XU, 2011; PANESAR et al, 2007; HOFVENDAHL e HAHN-HAGERDAL, 2000). Ademais, diferentes micro-organismos além das bactérias do ácido láctico também tem sido avaliados, como bactérias do gênero *Bacillus* e fungos filamentosos, bem como organismos geneticamente modificados, como *E. coli* e *S. cerevisiae*.

Por exemplo, para fermentação com bactérias lácticas, são utilizados resíduos como palha de milho (CUI, LI e WAN, 2011), biomassa de açafrão enriquecida com farinha de soja (NGUYEN et al, 2013), material lignocelulósico (WEE et al, 2009), vinhoto de destilaria

(DJUKIC-VUKOVIC et al, 2013; KARP et al, 2011), farelo de arroz (LI et al, 2012) e melaço (CHAISU et al, 2014). Para fermentação com espécies do gênero *Bacillus*, são utilizados palha de milho (OUYANG et al, 2013), lodo de residual de tratamento de resíduo municipal, enriquecido com hidrolisado de amido de tapioca (MA et al, 2014), palha de trigo (ZHANG et al, 2014) e farelo de amendoim como fonte de nitrogênio (MENG et al, 2012). Alguns autores ainda propuseram a fermentação espontânea ou com cultura desconhecida, de resíduos como casca de batata (LIANG, McDONALD e COATS, 2014) e casca de manga (JAWAD et al, 2013). Adicionalmente, alguns autores utilizam micro-organismos geneticamente modificados para obtenção de ácido láctico por fermentação, como Wang e colaboradores (2013), que utilizaram células de *E. coli* modificadas para fermentação de meio contendo melaço e milhocina como fontes de substrato e nutrientes.

Outros autores avaliaram a utilização de matérias-primas nobres ou não residuais, embora complexas, como soro de leite (KUMAR et al, 2014; SCHEPERS et al, 2006; AMITA TULI et al, 1985), batata doce (NGUYEN et al, 2013) e amido de mandioca (TOSUNGNOEM, CHOOKIETWATTANA e DARARAT, 2014; BOMRUNGNOK et al, 2012).

O Quadro 6.1 resume os resultados obtidos a partir de diversos dados da literatura, indicando os resultados mais relevantes para comparação, como concentração inicial de substrato, enriquecimento do meio, pré-tratamento ou não no caso de resíduos agroindustriais, controle de pH, concentração de ácido láctico obtida e produtividade, bem como o tempo total de fermentação.

Em todos os casos, foram encontradas concentrações mais elevadas de ácido láctico no meio fermentado, contudo, observa-se que, majoritariamente, durante a execução destes trabalhos, a inibição por produto foi evitada pelo controle do pH do meio, evitando sua brusca redução decorrente da formação de ácido pela atividade microbiana, e mantendo seu valor próximo do ótimo para o metabolismo de cada micro-organismo. Nesta etapa do presente trabalho, tal controle não foi realizado uma vez que foi necessário avaliar o potencial dos resíduos cervejeiros brutos para desenvolvimento das bactérias lácticas.

Vale observar, também, que para a obtenção destas elevadas concentrações de ácido láctico, é necessário fornecimento suficiente de substrato, que, para os diversos trabalhos citados no Quadro 6.1, foram maiores que os obtidos pela formulação dos meios deste

trabalho (Tabela 6.4). E, ainda, que para muitos dos estudos (linhas 1, 2, 7, 8, 11 14 e 16 do Quadro 6.1), materiais complexos foram previamente hidrolisados para sua utilização nos processos fermentativos. Demais trabalhos utilizaram fontes nobres de carboidratos, como glicose, lactose e soro de leite, o que motiva a avaliação de adição de fontes extras de açúcares fermentescíveis aos resíduos cervejeiros, enquanto estes, por sua vez, atuariam principalmente com fornecimento de fontes de nitrogênio para a atividade microbiana.

Os maiores valores de produtividade foram obtidos para fungo filamentoso da espécie *Rhizopus oryzae* (linha 16) e para bactérias da espécie *Bacillus subtilis* (linha 17), ambos com elevada concentração inicial de açúcares em meios sintéticos contendo glicose. Para bactérias lácticas, a maior produtividade foi encontrada para a espécie *Lactobacillus casei* (linha 14), em resíduo agroindustrial nobre (soro de leite) suplementado com glicose ou lactose até elevada concentração inicial de açúcares redutores. Os demais trabalhos com produtividades acima de 1 g/L.h utilizaram matérias-primas nobres, como a batata doce (linha 8), ou resíduos pré-tratados/hidrolisados, como o farelo de arroz e a biomassa de açafrão, por vezes adicionados de glicose extra, (linhas 14 e 16, respectivamente). Diversos outros autores constantes no Quadro 6.1 utilizaram resíduos agroindustriais, pré-tratados/hidrolisados, ou acrescidos de outras fontes de carbono, como glicose e lactose, com elevada concentração inicial de açúcares, obtendo produtividades menores que 1 g/L.h.

A avaliação de tais resultados motiva o estudo da produção de ácido láctico a partir dos resíduos cervejeiros, tendo em vista que os maiores valores de produtividade obtidos (0,29 g/L.h, no ponto 3 horas, para o experimento E7 PMFL, ou a produtividade média para 24 horas, de 0,1 g/L.h, para os experimentos E3 PMFL e E7 PMFL) (Tabela 6.6) indicam que estes meios apresentam grande potencial se comparados aos dados da literatura, levando-se em consideração a não adição de fontes extras de carbono, o não enriquecimento com fontes extras de nitrogênio, a ausência de pré-tratamento nos resíduos e a ausência do controle de pH no meio.

Quadro 6.1: Resumo de trabalhos da literatura sobre produção de ácido láctico

	Meio	Micro-organismo	C_{ARi} + Enriquecimento (g/L)	Controle pH	P_{AL} (g/L)	T_f (h)	Q_{PAL} (g/L.h)	Referência
1	Casca de batata	Lodo ativado	21 (material hidrolisado)	NI	14,7	192	0,08	Liang, McDonald e Coats, 2014
2	Sintético/Palha de milho	*L. rhamnosus / L. brevis*	20 (GLI + XY) 28,49 (GLI + XY da hidrólise)	$CaCO_3$	14,8 20,9	37 36	0,4 0,58	Cui, Li e Wan, 2011
3	Soro de leite/ sintético	*L. bulgaricus*	50 (soro de leite) 20 (LAC)	NI	19,6 20,6	96 96	0,20 0,22	Kumar et al, 2014
4	Sintético	*S. cerevisiae* (OGM)	80 (SAC, GLI e FRU)	$Ca(OH)_2$	30,8	45	0,68	Mimitsuka et al, 2014
5	Vinhoto	*L. rhamnosus*	50 (suplementado com GLI)	NaOH	35	50	0,66	Djukic-Vukovic et al, 2013
6	Melaço	*L. casei*	55 (meio MRS modificado)	NI	38,5	NI	NI	Chaisu et al, 2014
7	Palha de trigo	*B. coagulans*	26,5 (material hidrolisado)	Controlado	38,7	60	0,65	Zhang et al, 2014
8	Batata doce fresca	*L. paracasei*	2,98 (açúcar redutor livre) 4,27 (material hidrolisado) 2,69 (EL e PPT)	$CaCO_3$	38,8 123,4 123,5	72 72 72	0,54 1,71 1,72	Nguyen et al, 2013
9	Vinhoto/ melaço	*Lactobacillus* sp.	60 (ajustado com melaço)	$CaCO_3$	43	48	0,89	Karp et al, 2011
10	Alcachofra	*L. lactis*	80 (PPT, 20) 140	NaOH	50 93	40 190	1,19 0,49	Shi et al, 2012
11	Palha de milho	*Bacillus* sp.	80 (GLI do hidrolisado)	$CaCO_3$ ou NaOH	70	75	0,93	Ouyang et al, 2013
12	Melaço	*E. coli* (OGM)	100 (+ milhocina)	NI	75	156	0,48	Wang et al, 2013
13	Farelo de arroz	*L. rhamnosus*	100 (GLI + HAM, milhocina)	$CaCO_3$	85,3	72	1,19	Li et al, 2012
14	Soro de leite	*L. casei*	100 (GLI + LAC; EL, 10)	NI	90	35	2,57	Senthuran et al, 1999
15	Açafrão	*L. paracasei*	70 (HAM; FS, 25)	$CaCO_3$	93,1	72	1,29	Nguyen, et al, 2013
16	Sintético	*Rhizopus oryzae*	120 (GLI)	$CaCO_3$, ureia, NH_3	102,4	34	3,01	Wang et al, 2014
17	Sintético	*B. subtilis*	200 (GLI; EL, 75)	NI	143,2	52	2,75	Gao et al, 2012
18	Resíduos cervejeiros	*L. delbruecki* subsp. *delbruecki*	-	-	2,5	18	0,14	**Presente trabalho**

C_{Ari} = concentração inicial de açúcares; P_{AL} = concentração de ácido láctico; Tf = tempo de fermentação; Q_{PAL} = produtividade de ácido láctico
Fontes de carboidratos: GLI = Glicose; XY = xilose; LAC = lactose; SAC = sacarose; FRU = frutose; ARA = arabinose; HAM = hidrolisado de amido
Fontes de nitrogênio: EL = extrato de levedura; PPT = peptona; FS = farinha de soja
NI = não informado

6.3.2 Atividade Proteolítica

A atividade proteolítica de cada extrato bruto obtido após a centrifugação sob refrigeração (2500 g, 15 min., 4°C), bem como a produtividade, foram determinadas nos tempos 6, 12 e 18h de fermentação, cujos resultados são apresentados na Tabela 6.10, juntamente com os valores calculados para a produtividade.

Tabela 6.10: Atividade proteolítica e produtividade dos extratos brutos para diferentes tempos de fermentação

Experimento*	6h		12h		18h	
	A_P (U/mL)	Q_{PAP} (U/mL.h)	A_P (U/mL)	Q_{PAP} (U/mL.h)	A_P (U/mL)	Q_{PAP} (U/mL.h)
E1 PMFL (BM)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
E2 PMFL (TQ)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
E3 PMFL (LRC)	1,98	0,33	1,39	0,12	2,05	0,11
E4 PMFL (BM + TQ)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
E5 PMFL (BM + LRC)	0,19	0,03	0,15	0,01	0,25	0,01
E6 PMFL (TQ + LRC)	0,08	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
E7 PMFL (BM + TQ + LRC)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

*PMFL: planejamento de misturas para fermentação láctica; BM: bagaço de malte; TQ: *trub* quente; LRC: levedura residual cervejeira.
A_P – Atividade proteolítica
Q_{PAP} – Produtividade de atividade proteolítica

A partir destes resultados, é possível observar que já nas 6 primeiras horas, definidas anteriormente como Fase 1, de intensa atividade da cultura láctica, ocorreu liberação de proteases em alguns dos experimentos.

Os meios elaborados a partir dos resíduos não foram acrescidos de nenhuma fonte de carbono além das que já foram disponibilizadas em sua composição. Ademais, o parâmetro proteína bruta total, e não proteína bruta solúvel, foi escolhido como base para formulação de cada meio, que conteve 4% de proteínas, pressupondo-se que a conhecida atividade proteolítica das bactérias lácticas (SAVIJOKI, INGMER e VARMANEN, 2006; GOBBETTI et al, 2005; SHINATA e SHAH, 2000; LAW e HAANDRIKMAN, 1995) tivesse efeito sobre a fração insolúvel, hidrolisando proteínas que pudessem ser utilizadas como fonte de carbono.

Por um lado, esta hipótese foi confirmada, tendo em vista que a baixa concentração de açúcares fermentescíveis nos meios estimulou a produção de proteases pela cultura microbiana, para utilização das cadeias carbônicas de aminoácidos, proteínas e peptídeos como fonte de carbono. Entretanto, este fator acarretou em baixa produção de ácido láctico no meio. Esta hipótese já foi discutida no Item 6.3.

Ainda que válida esta hipótese, não se anula a possibilidade de se trabalhar apenas com a fração solúvel de cada resíduo, tendo em vista que os melhores resultados para atividade proteolítica foram obtidos na presença de LRC. Este resíduo contém a fração solúvel mais nobre, uma vez que a levedura cervejeira tem significativas chances de sofrer lise ao final de sua fase ativa ou durante seu processo de secagem, liberando para o meio compostos solúveis, incluindo proteínas (hipótese discutida no Capítulo 4).

Por outro lado, tanto o bagaço de malte como o *trub* são resíduos esgotados e insolúveis, gerados no processo cervejeiro. O primeiro é removido após o esgotamento das frações solúveis do malte no preparo do mosto doce, e constituído predominantemente por proteínas estruturais, de maior complexidade (ALIYU e BALA, 2011). Segundo O'Rourke, 2002, a maior parte das proteínas insolúveis e de elevada massa molar são removidas junto ao bagaço de malte, durante a clarificação do mosto, de forma que esta fração pode não ter tido efeito indutivo para a atividade proteolítica das bactérias lácticas. O segundo resíduo, *trub* quente, é gerado pela insobilização de proteínas desnaturadas e complexadas, que também podem formar complexos com polifenóis de elevada massa molar e polissacarídeos, também insolúveis no mosto, resultando em um material predominante proteico complexo (BARCHET, 1993) e, portanto, de difícil disponibilidade para a cultura láctica.

Tal resultado também foi corroborado pela avaliação da atividade proteolítica da bactéria láctica (Capítulo 5), quando não foi observada atividade de proteases no extrato obtido a partir do cultivo de *L. delbrueckii* em meio MRS, embora diversos autores tenham quantificado esta atividade (TERZIC-VIDOJEVIC et al, 2014; GONZALEZ et al, 2010; DONKOR et al, 2007). Ratificando os resultados obtidos no presente trabalho, Gobbetti et al (1999) e Di Cagno et al (2003), também não obtiveram extrato com atividade proteolítica do cultivo de bactérias lácticas em meio MRS. O meio MRS trata-se de um meio próprio para ativação e propagação de culturas lácticas, reconhecidas como exigentes nutricionalmente, e, portanto, contém as características necessárias para sua reprodução de maneira adequada, não exigindo a produção de proteases. No entanto, no presente trabalho, utilizando resíduos cervejeiros ricos em fração proteica, houve produção de tais enzimas.

Os maiores valores de atividade proteolítica foram obtidos para experimentos contendo LRC em quantidade iguais ou superior a 50%, indicando que este resíduo apresentou maior efeito sobre a fermentação láctica (já discutido) e sobre a produção de proteases.

Diferentemente do discorrido para a acidez, a presença do *trub* quente parece ter efeito contrário à geração de atividade proteolítica no meio. Novamente, o seu elevado teor de açúcares redutores pode ter proporcionado estes resultados, uma vez que na presença de açúcares fermentescíveis, as bactérias lácticas não necessitam de produzir enzimas proteolíticas para utilizar as proteínas como única fonte de carbono.

Esta hipótese é corroborada pela análise dos resultados de todos os meios que contém *trub* quente, E2, E4, E6 e E7 (PMFL). Quando presente isoladamente, no experimento E2 PMFL, o teor de açúcar do *trub* não foi suficiente para compensar a baixa concentração de fontes de nitrogênio solúveis, obtendo-se como resultado a menor acidez e atividade proteolítica nula, como já mencionado. Entretanto, quando adicionado de outro resíduo, seja do bagaço de malte (E4 PMFL), da levedura residual (E6 PMFL) ou dos dois juntos (E7 PMFL), houve elevação da acidez, embora a atividade proteolítica tenha se mantido nula ou desprezível, conforme observado na Tabela 6.10.

Análise estatística dos resultados

Da mesma maneira que para a acidez, foi construído o modelo matemático referente à atividade proteolítica, sendo escolhido, contudo, o tempo de 6 horas de fermentação, onde o máximo da atividade proteolítica já havia sido atingido. O modelo e suas previsões são apresentados nas Tabelas 6.11 e 6.12, respectivamente.

Tabela 6.11: Modelo matemático para a resposta Atividade Proteolítica para o primeiro planejamento experimental

Modelo	Parâmetros
$AP = 0{,}00x_1 + 0{,}00x_2 + 1{,}98x_3 + 0{,}00x_1x_2 + 3{,}00x_1x_3 - 3{,}65x_2x_3 + 2{,}72x_1x_2x_3$	x_1: BM x_2: TQ x_3: LRC x_{ij} e x_{ijk}: interações*

AP: atividade proteolítica
*Com i, j e k variando de 1 a 3.

Para o modelo de atividade proteolítica, algumas discrepâncias foram notadas entre os valores medidos e os preditos, para os experimentos E5 e E7 (PMFL). Tal fato pode ser decorrente da dificuldade de modelagem matemática da atividade microbiana, principalmente para produtos não associados ao crescimento, como as enzimas

proteolíticas, diferente do observado para a acidez (Item 6.3.1), uma vez que o ácido láctico é um produto do metabolismo primário das bactérias lácticas.

Tabela 6.12: Valores de atividade proteolítica medidos experimentalmente e seus respectivos correspondentes previstos pelo modelo

Experimento	Atividade Proteolítica (U/mL) – 6h	
	Respostas (Medidas)	Previsão (Modelo)
E1 PMFL	0,0	0,0 (7×10^{-17})
E2 PMFL	0,0	0,0 (6×10^{-17})
E3 PMFL	2,0	1,98
E4 PMFL	0,0	0,0 (7×10^{-17})
E5 PMFL	0,2	1,74
E6 PMFL	0,1	0,08
E7 PMFL	0,0	0,69

PMFL – Planejamento de misturas para fermentação láctica

Apesar disto, na região experimental onde se obteve a máxima atividade proteolítica (experimento E3 PMFL), o modelo comportou-se de maneira adequada, podendo ser utilizado para a tentativa de otimização do meio. Ademais, a diferença entre os valores medidos experimentalmente para cada experimento foi bastante notória, deixando claro que o experimento E3 PMFL deveria ser utilizado para obtenção do extrato proteolítico.

Vale ressaltar que todas as análises feitas consideram a presença de cada resíduo como efeitos isolados, mas, na prática, cada resíduo apresenta composição química diferente, que pode influenciar as respostas, como fatores associados. Entretanto, avaliando os resíduos como fatores únicos de estudo, e as superfícies de resposta para atividade proteolítica, fica claro que a presença de LRC foi fundamental para obtenção de proteases. O máximo de atividade obtida tende para os meios contendo LRC como fonte única de nitrogênio, havendo redução a partir da adição de quaisquer outros resíduos.

A partir do modelo gerado, foi possível construir uma superfície de resposta, indicada na Figura 6.7.

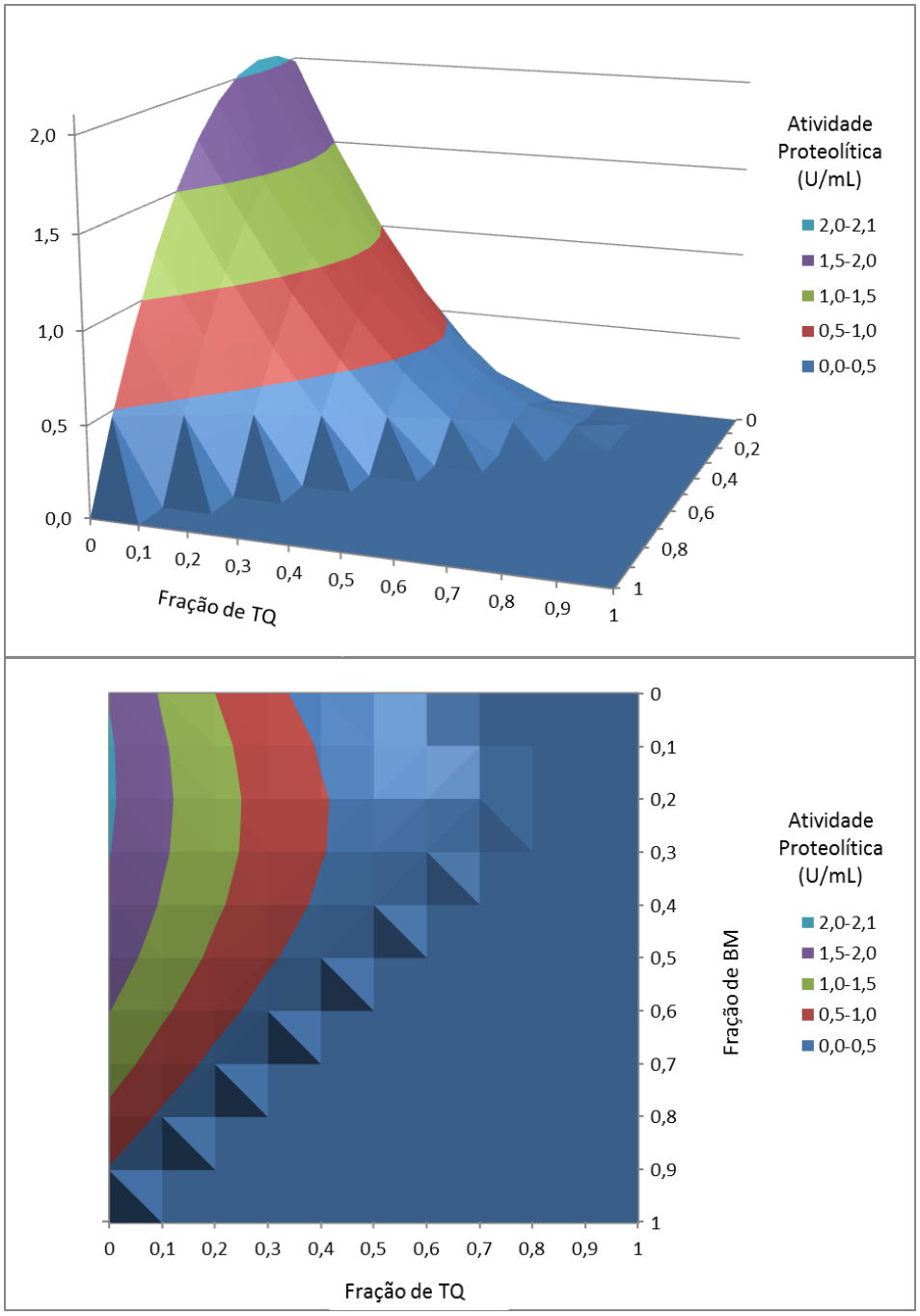

Figura 6.7: Superfície de resposta para a atividade proteolítica (U/mL) do extrato fermentado bruto.

A observação da Figura 6.7 ratifica que para que sejam obtidos os maiores valores de atividade proteolítica do extrato bruto, os meios devem conter fração molar do *trub* quente próxima de zero, e baixos valores para fração molar do bagaço de malte, indicando, novamente, que são necessárias altas concentrações de levedura residual, em relação aos demais resíduos avaliados.

A comparação de medidas de atividade proteolítica com a literatura é bastante dificultada devido à existência de diversas técnicas de quantificação, bem como de diferentes unidades para expressar os resultados. Algumas técnicas quantificam produtos da proteólise liberados no meio, enquanto que outras quantificam os substratos, antes e após a atuação das enzimas. O método utilizado no presente trabalho leva em consideração a concentração de substrato (azocaseína), dosado por espectrofotometria no tempo zero e no tempo 40 minutos de adição do extrato proteolítico e a unidade de atividade definida em função da alteração a cada 0,01 da unidade de absorbância (CHARNEY e TOMARELLI, 1947).

Ikram-ul-Haq e Mukhtar (2006) avaliaram a biossíntese de proteases por *Lactobacillus paracasei* em meio sintético, contendo triptona (15 g/L), extrato de levedura (5 g/L) e extrato de carne (5 g/L) como fontes de nitrogênio, e lactose (20 g/L) e glicose (5 g/L) como fontes de carbono, através da dosagem de caseína antes e após reação com o extrato enzimático. Para 15 diferentes linhagens estudadas, obtiveram extratos proteolíticos com atividade mínima de 1,26 U/mL e máxima de 5,80 U/mL.

Piraino et al (2008) estudaram a atividade proteolítica intra e extracelular de diferentes gêneros e espécies de bactérias lácticas cultivadas em meio caldo MRS para lactobacilos através do método da azocaseína. Observaram ΔAbs entre 0,01 e 0,07 para os diferentes cultivos. No presente trabalho, o valor de atividade proteolítica calculado corresponde a um ΔAbs de 0,400 (para o experimento E3 PMFL).

Discussões mais profundas comparando trabalhos encontrados na literatura sobre produção de enzimas proteolíticas foram reservadas para o Capítulo 7, que teve por objetivo a otimização da fermentação láctica.

6.4 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que:

- Os resíduos cervejeiros apresentaram-se como potenciais para elaboração de meios para desenvolvimento de bactérias lácticas. Estas, por sua vez, promoveram geração de acidez, devido ao seu metabolismo fermentativo, com liberação de ácido láctico no meio;
- Os meios contendo apenas LRC (E3 PMFL) e o meio contendo os três resíduos (BM, TQ e LRC, experimento E7 PMFL) apresentaram o maior valor final de acidez, sendo este último o que levou à maior produtividade, além de apresentar uma região mais plana, melhor para se trabalhar, na superfície de resposta;
- A presença de proteínas no meio e a ausência de fontes de carbono extra levaram as bactérias lácticas à liberação de enzimas proteolíticas extracelulares de forma a viabilizar seu metabolismo fermentativo, acarretando na geração de um extrato proteolítico;
- O experimento E3 PMFL (contendo exclusivamente LRC) apresentou o maior potencial para produção de tais enzimas.

A destinação dos resíduos cervejeiros para elaboração de meios para fermentação láctica se faz interessante em relação ao reuso de resíduos agroindustriais. A obtenção de produtos de valor agregado a partir do bioprocesamento destes materiais acarreta na diminuição da carga orgânica a ser destinada para tratamentos de efluentes, uma vez que parte dos compostos orgânicos será convertida a produtos de interesse, neste caso, ácido láctico e extrato enzimático com atividade proteolítica.

O resultado obtido no planejamento de misturas utilizando apenas os resíduos cervejeiros para formulação dos meios de fermentação motivou o estudo da variação da concentração de nitrogênio e da adição de fonte de carbono extras na tentativa de otimizar a produção de enzimas proteolíticas. Para tanto, foi elaborado um segundo planejamento experimental, fatorial, que será abordado no Capítulo 7, a seguir.

Capítulo 7

Produção de extrato proteolítico

7.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as concentrações de proteína bruta e de glicose no meio à base de resíduo cervejeiro (LRC), a partir de planejamento experimental fatorial, para obtenção de extrato proteolítico por fermentação láctica com *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* INCQS 383, visando a sua otimização;
- Modelar os resultados para obtenção de superfícies de respostas referentes à atividade proteolítica;
- Eliminar a interferência dos efeitos de bloco pela repetição das melhores condições experimentais dos dois planejamentos, de misturas e fatorial.

7.2 MATERIAIS E MÉTODOS

7.2.1 Micro-organismo

Cultura láctica de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* INCQS 383, previamente selecionada em função de sua elevada atividade proteolítica (Capítulo 5). Condições de conservação e de cultivo já descritas anteriormente (Item 5.2.2).

7.2.2 Resíduo cervejeiro

No presente capítulo, apenas a levedura residual cervejeira (LRC) foi utilizada como fonte de nitrogênio na formulação dos meios de fermentação, tendo em vista os resultados obtidos no Capítulo 6. Este resíduo apresentou melhor efeito indutivo sobre a produção de proteases extracelulares pela bactéria láctica em estudo (Figura 6.7). As características químicas deste resíduo estão apresentadas no Capítulo 4.

7.2.3 Desenvolvimento experimental

7.2.3.1 Planejamento experimental e formulação dos meios

No capítulo 6 foi produzido o extrato proteolítico a partir do planejamento de misturas, com os três resíduos sólidos cervejeiros (BM, TQ e LRC), sem adição de fontes extras de açúcar e com teor de proteína bruta total fixo em 4% (m/v), conforme já justificado anteriormente.

Nesta etapa do trabalho, a melhor condição do planejamento de misturas (E3 PMFL, Capítulo 6), foi utilizada como ponto de partida para um novo planejamento experimental (fatorial) para modelagem e otimização da produção de extrato proteolítico. Foram avaliados os efeitos de dois fatores quantitativos, a concentração de proteínas e a adição de diferentes concentrações de glicose no meio.

A adição de glicose foi fundamentada em dados da literatura que reportam a importância da presença de um açúcar fermentescível para estimular a atividade de diferentes espécies de bactérias e fungos filamentosos, com possível efeito sobre a produção de proteases. Por exemplo, diversos autores avaliaram a atividade proteolítica de

bactérias lácticas e/ou dos extratos intra e extracelulares obtidos a partir do crescimento destes agentes em diferentes meios (caldo MRS, leite desnatado, leite desnatado suplementado com glicose e extrato de levedura e leite), variando as concentrações de açúcar fermentescível entre 1 e 7% (GONZALEZ et al, 2010; KIVANÇ, YILMAZ e ÇAKIR, 2009; DONKOR et al, 2006; IKRAM-UL-HAQ e MUKHTAR, 2006; KABADJOVA-HRISTOVA et al, 2006; MOULAY et al, 2006; Di CAGNO et al, 2003; El SODA et al, 2003; SHINATA e SHAH, 2000; GOBBETTI et al, 1999; DAKO et al, 1995).

Outros trabalhos demonstraram o efeito da relação carbono/nitrogênio sobre a produção de enzimas proteolíticas a partir da atividade de fungos filamentosos e de diferentes espécies de bactérias. Nestes estudos, realizados principalmente com o gênero *Aspergillus* e espécies do gênero *Bacillus* e *Pseudomonas*, as concentrações de fontes de carbono (açúcar assimilável) e de fontes proteicas variaram entre 0,5 e 1%, e 0,5 e 3%, respectivamente (DINCER et al, 2014; JAIN et al, 2014; KUMAR, ANANTHAN e PRABHU, 2014; LIN et al, 2014; PANT et al, 2014; RATHOD e PATHAK, 2014; BAJAJ, SHARMA e SINGH, 2013; MAGHSOODI, et al, 2013; SUGANTHI et al, 2013; RAJ et al, 2012; ÇALIK et al, 2002).

Para realização do presente estudo, foi utilizado um planejamento fatorial de 2 níveis e 2 fatores (2^2), com 2 réplicas no ponto central, totalizando 6 experimentos. A Tabela 7.1 apresenta a matriz de experimentos, indicando os percentuais de proteína (1 e 7%), fator 1 (x_1), com base na composição proteica do resíduo LRC, e de glicose (1 e 7%), fator 2 (x_2), adicionados em cada formulação, considerando-se 200 mL de meio reacional, volume utilizado em cada ensaio. A sigla PFFL foi utilizada para denotar "planejamento fatorial para fermentação láctica", para diferenciar do planejamento de misturas realizado no Capítulo 6.

Tabela 7.1: Experimentos do planejamento fatorial de 2 níveis e 2 fatores para volume final de cada ensaio (200 mL)

Experimento*	Proteína (%)	Glicose (%)	Massa LRC (g)	Massa glicose (g)
E1 PFFL	7 (+)	7 (+)	30,7	14,0
E2 PFFL	1 (-)	7 (+)	4,4	14,0
E3 PFFL	7 (+)	1 (-)	30,7	2,0
E4 PFFL	1 (-)	1 (-)	4,4	2,0
E5 PFFL	4 (PC)	4 (PC)	17,5	8,0
E6 PFFL	4 (PC)	4 (PC)	17,5	8,0

*PFFL: Planejamento fatorial para fermentação láctica; PC: ponto central; LRC: levedura residual cervejeira.

Adicionalmente, a Tabela 7.2 apresenta a composição de cada meio, calculada em função da massa de resíduo adicionada e da composição química do resíduo, determinada e apresentada no Capitulo 4.

Tabela 7.2: Composição dos meios do planejamento experimental de misturas PFFL*

Composição** (% m/v)	Experimentos					
	E1 PFFL	E2 PFFL	E3 PFFL	E4 PFFL	E5 PFFL	E6 PFFL
Cinzas	0,91	0,13	0,91	0,13	0,52	0,52
ARs	7,20	7,03	1,20	1,03	2,11	2,11
Ns	0,39	0,06	0,39	0,06	0,22	0,22
Ps	2,25	0,32	2,25	0,32	1,29	1,29
FANs (mg %)	62,85	9,00	62,85	9,00	35,86	35,86

*PFFL: planejamento fatorial para fermentação láctica;
**ARs: açúcar redutor solúvel; Ns: nitrogênio solúvel; Ps: proteína bruta solúvel; FANs: amino ácidos (*free amino nitrogen*) da fração solúvel, expressos em glicina.

Os resultados foram submetidos à regressão por um modelo quadrático, dado pela equação 7.1, a seguir:

$$\hat{y} = b_0^* + b_1^* x_1 + b_2^* x_2 + b_{12}^* x_1 x_2 + b_{11}^* x_1^2 + b_{22}^* x_2^2 \qquad \text{(Equação 7.1)}$$

Onde:

Y: resposta medida;

x_1 e x_2: fatores avaliados;

b_0: coeficiente que corresponde à interseção dos eixos;

b_1 e b_2: coeficientes lineares de cada fator, respectivamente;

b_{12}: coeficiente da interação entre os fatores;

b_{11} e b_{22}: coeficientes quadráticos.

7.2.3.2 Fermentação e determinações analíticas

O preparo e a esterilização dos meios se deu a partir do mesmo procedimento adotado no Item 6.2.3.2, com exceção de que, nesta etapa, a fermentação se deu em meio tamponado (tampão fosfato 50 mM, pH 6,5), com o intuito de evitar a brusca redução do pH, como consequência da liberação de ácido láctico pelo metabolismo das bactérias

lácticas, conforme discutido no Capítulo 6. Sabe-se que alterações no pH podem promover desnaturação de proteínas, interferindo na análise quantitativa da atividade proteolítica.

Os meios (Tabela 7.1) foram assepticamente inoculados com 10% (v/v) de cultivo de *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* INCQS 383, na fase exponencial do crescimento em caldo MRS, com absorvância (480 nm) de 0,791. Desta forma, a massa seca inicial de células no meio reacional foi de aproximadamente 4,5 mg/mL, calculada a partir da curva Abs *vs* massa seca (Figura 5.6). Os cultivos foram incubados, em *shaker* rotacional (Cientec CT712RN), com a temperatura controlada em 37°C, e lenta agitação (100 rpm) apenas para manter a homogeneização do meio.

Nesta etapa, foi definido o tempo de 6 horas de fermentação, com base nos resultados do Capítulo 6. Findo este tempo, todos os experimentos foram separados em suas frações sólida e líquida por centrifugação (centrífuga HERMILE, modelo Z400, 2500 g, 15 min., 4°C). Da fração líquida obtida (extrato bruto), foi determinada a atividade proteolítica pelo método da azocaseína (CHARNEY e TOMARELLI, 1947). Adicionalmente, foi determinado o pH (PHTEK, modelo PHS-3B) dos meios no tempo zero e no tempo final, para avaliação do efeito do tampão.

Os resultados foram avaliados estatisticamente pela construção de modelos matemáticos e de superfície de resposta. Ademais, os efeitos calculados para o modelo tiveram sua significância avaliada através da variância experimental, calculada a partir das réplicas do ponto central, conforme as equações 7.2 e 7.3.

$$s^2 = {(\sum y_i - \bar{y})^2}/{n-1} \qquad \text{(Equação 7.2)}$$

$$IC = efeito \pm t_{\alpha,n} \times s_{efeito} \qquad \text{(Equação 7.3)}$$

Onde:

s^2: variância experimental;

y_i: resposta medida;

$\bar{y}$: média das respostas;

n: número de experimentos no ponto central;

$t_{\alpha,n}$ = t de Student;

efeito: coeficiente calculado para o modelo;

IC: intervalo de confiança.

7.2.4 Efeitos de bloco

Para fins comparativos entre os resultados do Capítulo 6 com os resultados obtidos no presente capítulo, as melhores condições de cada um foram repetidas simultaneamente, nas mesmas condições operacionais. Desta forma, são evitadas as interferências de fatores que não são objeto do estudo, que recebem o nome de efeitos de bloco. Os efeitos de bloco compreendem parâmetros extrínsecos (ex.: temperatura e agitação) e parâmetros intrínsecos (ex.: pH e inóculo).

Todos os experimentos foram conduzidos nos mesmos equipamentos e condições de processo. Porém, os cultivos utilizados como inóculo encontravam-se em diferentes pontos da fase exponencial de crescimento. Para o planejamento de misturas (Capítulo 6), partiu-se como inóculo de um ponto próximo ao início da fase exponencial (Abs_{480} 0,394), o que acarreta um menor número de células em plena fase de atividade. Já para o planejamento fatorial, a inoculação se deu com células também na fase exponencial, embora próximas à fase de desaceleração do crescimento (Abs_{480} 0,791), portanto, um maior número de células com menor atividade.

Nesta etapa, foi empregado como inóculo um cultivo com densidade óptica (480 nm) de 0,332. Ademais, foi contemplada a condição otimizada pelo planejamento fatorial, obtida pela superfície de resposta construída para a atividade proteolítica, identificada pela sigla $PFFL_{modif}$.

O cálculo do efeito de blocos entre a primeira e a segunda produção de cada experimento (E3 PMFL e $PFFL_{modif}$), foi feito pela equação 7.4.

$$\boldsymbol{E} = \left[\frac{\sum_{i=1}^{n/2} yi - \sum_{i=(n/2)+1}^{n} yi}{n/2}\right] \qquad \text{(Equação 7.4)}$$

Onde:

n: número de amostras;

y: resposta (atividade proteolítica);

E: efeito de bloco.

7.2.5 Produtividade da atividade proteolítica

A atividade proteolítica dos extratos proteolíticos otimizados nos dois planejamentos experimentais foi avaliada no tempo de 6 horas de fermentação, definido no capítulo anterior, e inclusive, no de 3 horas. Isto porque, foi observado que a atividade microbiana promoveu rápida elevação da acidez dos meios no planejamento de misturas (Figura 6.2), com indicativo de que não houve fase *lag* de adaptação aos meios elaborados a partir dos resíduos cervejeiros.

Os resultados referentes às atividades proteolíticas e respectivas produtividades foram submetidos ao teste de Tukey de comparação de médias.

7.2.6 Recuperação de proteases

O extrato enzimático bruto, obtido a partir da melhor condição experimental, foi submetido à etapa de recuperação por precipitação com etanol (WAGLAY, KARBOUNE e ALLI, 2014; BIAZUS et al, 2010; BARTOVA e BARTA, 2009; CARREIRA et al, 2009; FERNANDEZ-LAHORE, FRAILE e CASCONE, 1998). Para tanto, etanol P.A. foi adicionado na proporção de 2:1 (v:v), de forma a atingir a concentração final próxima de 65%, sendo a mistura foi mantida sob agitação por 30 minutos, a 4°C. O material precipitado foi filtrado à vácuo em membrana de poro 3 µm e a seguir disposto em dessecador para secagem em estufa a 30°C *overnight*. Estas etapas são ilustradas na Figura 7.1. Uma massa conhecida do material seco foi ressuspendida em tampão acetato (50 mM, pH 5,0) para determinação da atividade proteolítica, cujo resultado foi expresso em U/g.

Figura 7.1: Precipitação com etanol e recuperação das enzimas proteolíticas por filtração.
(A) precipitado; (B) aparato de filtração a vácuo; (C) vista superior da membrana durante a filtração; (D) vista superior da membrana a ser disposta para secagem.

7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.3.1 Fermentação láctica/planejamento fatorial

Na Figura 7.2 é apresentada a redução relativa do pH decorridas 6 horas de fermentação láctica. Houve uma pequena diminuição em todos os experimentos realizados, ao contrário do observado quando utilizado um meio não tamponado (Tabela 6.5, Capítulo 6). Logo, pode-se inferir que o emprego do tampão fosfato na elaboração dos meios de fermentação teve efeito positivo no controle do pH. Ademais, aparentemente, o efeito neutralizante foi maior quando foram utilizadas as maiores concentrações do resíduo LRC, ratificando resultados anteriores (Item 6.3.1, capítulo 6).

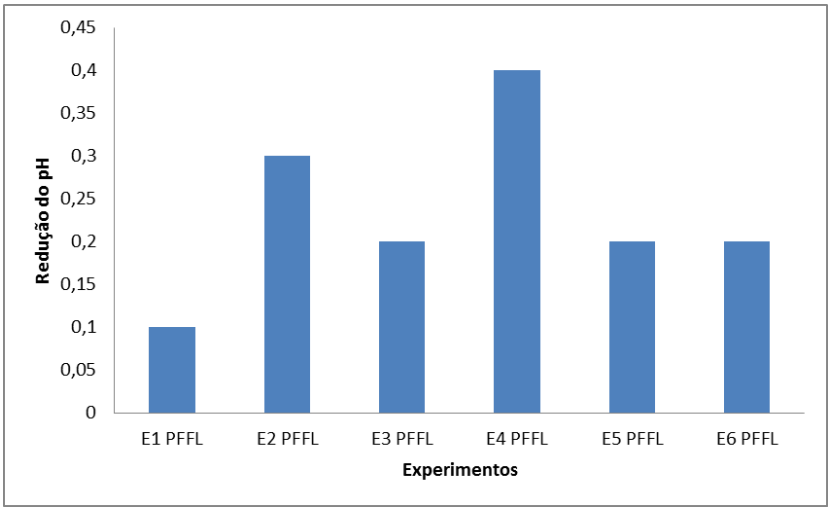

Figura 7.2: Redução do pH no meio em 6 h de fermentação.

A Tabela 7.3 apresenta os resultados das atividades proteolíticas dos extratos brutos obtidos em 6 horas de fermentação, previamente centrifugados (2500 g, 15 min., 4°C). Observa-se que o experimento E1 PFFL, com 7% de glicose e 7% de proteínas totais (resíduo LRC), apresentou a melhor atividade proteolítica para o tempo determinado. Nota-se, ainda, que os resultados referentes aos experimentos E5 PFFL e E6 PFFL, duplicatas do ponto central, indicaram boa reprodutibilidade.

Quando empregados baixos teores de proteína (1%), não foi detectada atividade proteolítica no meio (experimentos E2 PFFL e E4 PFFL). Adicionalmente, nota-se que no experimento E2 PFFL, em que a relação Glicose/Proteína foi alta (7:1), não foi detectada atividade proteolítica. O mesmo resultado foi obtido para o experimento E4 PFFL, no qual

esta razão foi 1:1, mas ambas as concentrações (glicose e proteína) foram baixas (1%). Estes resultados ratificam que as proteases extracelulares são produzidas por mecanismos indutivos.

Tabela 7.3: Atividade proteolítica dos extratos brutos obtidos para 6 h de fermentação

Experimento*	Atividade Proteolítica (U/mL)
E1 PFFL (7%P + 7% GLI)	1,8
E2 PFFL (1%P + 7% GLI)	0,0
E3 PFFL (7%P + 1% GLI)	0,5
E4 PFFL (1%P + 1% GLI)	0,0
E5 PFFL (4%P + 4% GLI)	0,5
E6 PFFL (4%P + 4% GLI)	0,4

*PFFL: Planejamento fatorial para fermentação láctica; P: proteína; GLI: glicose.

Os resultados obtidos permitiram construir o modelo matemático quadrático referente à atividade proteolítica, apresentado na Tabela 7.4, cujas respostas preditas encontram-se Tabela 7.5.

Tabela 7.4: Modelo matemático para a resposta Atividade Proteolítica para o planejamento experimental fatorial

Modelo	Parâmetros
$AP = 0{,}440 + 0{,}568x_1 + 0{,}333x_2 + 0{,}330x_1x_2 + 0{,}00x_1^2 + 0{,}130x_2^2$	x_1: % proteínas x_2: % glicose x_1x_2: interação

AP: atividade proteolítica

Tabela 7.5: Valores de atividade proteolítica medidos experimentalmente e respectivos valores previstos pelo modelo

Experimento	Atividade Proteolítica (U/mL)	
	Respostas (Medidas)	Previsão (Modelo)
E1 PFFL	1,800	1,800
E2 PFFL	0,005	0,005
E3 PFFL	0,475	0,475
E4 PFFL	0,000	0,000 ($3{,}6 \times 10^{-16}$)
E5 PFFL	0,465	0,440
E6 PFFL	0,415	0,440

PMFL – Planejamento fatorial para fermentação láctica

Diferentemente do observado para o planejamento de misturas, no Capítulo 6, o modelo construído para atividade proteolítica pelo planejamento fatorial apresenta boa

representatividade da área estudada, uma vez que os valores previstos são semelhantes aos valores determinados experimentalmente (Tabela 7.5). Tal fato pode ser associado à maior homogeneidade da composição dos meios nesta etapa (Tabela 7.2), já que foram elaborados a partir de um único resíduo (LRC), enquanto que no planejamento de misturas foram utilizados os três resíduos, e, portanto, os meios apresentavam composição bastante diferenciada (Tabela 6.2).

Os coeficientes calculados para os modelos do planejamento fatorial (Tabela 7.4) permitem avaliar a influência de cada fator, considerados independentes entre si, sobre as respostas esperadas. Quanto maior o módulo de cada coeficiente, maior será sua participação no cálculo das respostas. Já os sinais, positivo (+) ou negativo (-), indicam aumento ou redução dos valores esperados, respectivamente. Observa-se que o maior coeficiente, e de sinal positivo, é calculado para o fator x_1 (% proteínas), indicando sua significativa participação sobre a resposta medida (atividade proteolítica). A interação entre os fatores x_1 e x_2 (% glicose), apresenta-se tão significativa quanto o efeito do fator x_2 isoladamente, ambos menores que o efeito de x_1 isoladamente.

A partir do ponto central é possível determinar a variância experimental e, por conseguinte, o intervalo de confiança (IC) para os efeitos calculados para o modelo, conforme as Equações 7.2 e 7.3. Apesar de ter sido constatada a reprodutibilidade dos experimentos a partir dos resultados obtidos para os pontos centrais (Tabela 7.3), os intervalos de confiança de 90 e 95% calculados foram elevados (Equações 7.5 e 7.6, respectivamente). A minimização do erro poderia ser alcançada com maior número de repetições.

$$IC_{90\%} = efeito \pm 0{,}22 \qquad \text{(Equação 7.5)}$$

$$IC_{95\%} = efeito \pm 0{,}46 \qquad \text{(Equação 7.6)}$$

Para o caso de 95% de confiança, os coeficientes do fator x_2 e da interação x_1x_2 (Tabela 7.4) podem ser englobados pelo erro experimental, não tendo significância. Tal fato reforça a observação de que o fator x1 (% proteínas) teve maior influência sobre a geração de atividade proteolítica no meio do que o fator x2 (% glicose).

A partir do modelo gerado, foi possível construir uma superfície de resposta (Figura 7.2) para a produção de atividade proteolítica em função dos percentuais de proteínas e de glicose presentes no meio.

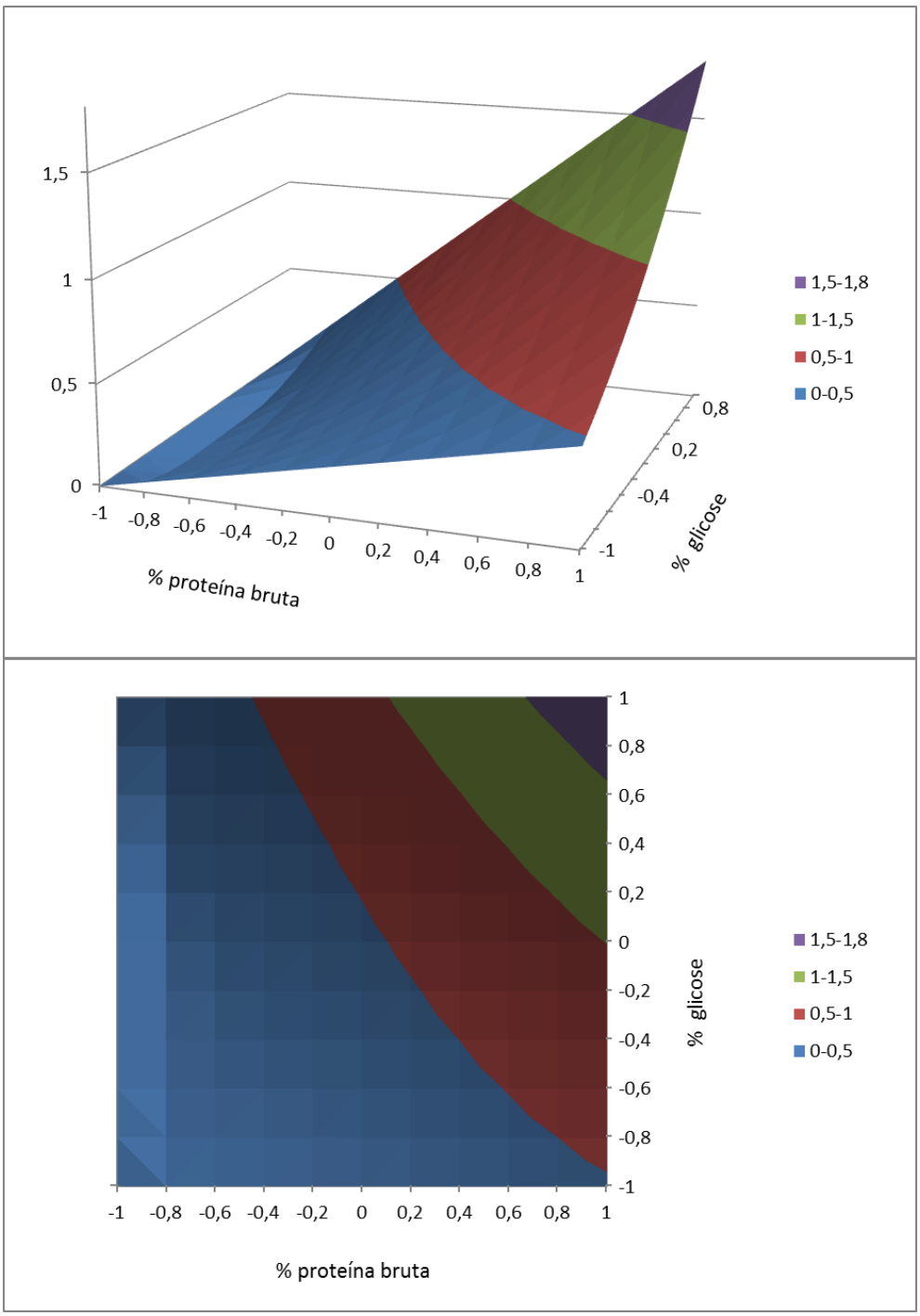

Figura 7.2: Superfície de resposta para a atividade proteolítica (U/mL) do extrato fermentado bruto. (Eixos em variáveis codificadas, -1 equivale a 1% e 1 equivale a 7%, para ambos os fatores).

Pela observação da Figura 7.2, nota-se que há uma tendência de aumento da atividade proteolítica com o aumento dos dois fatores avaliados (concentração de proteínas e de glicose), uma vez que a região de cor roxa (indicativo do máximo de atividade enzimática) está localizada mais à direta e superior na figura. É possível delimitar esta região de máximo a partir das concentrações de 6% de proteínas e 6% de glicose. Entretanto, como observado pela análise da Tabela 7.3 e dos coeficientes do modelo (Tabela 7.4), o teor de proteínas teve maior efeito sobre a resposta observada.

Uma hipótese discutida no Capítulo 6 é que a presença de açúcar redutor nos resíduos cervejeiros poderia ter promovido redução da atividade proteolítica, uma vez que, em condições de escassez, as bactérias lácticas produziriam tais complexos enzimáticos extracelulares para utilização das proteínas e aminoácidos como fonte de carbono, além de nitrogênio (Item 6.3.2). Embora os resultados aqui obtidos indiquem que a adição de glicose promoveu aumento da atividade proteolítica (Figura 7.2), a hipótese levantada permanece válida. Tem-se como justificativa que, na presença de glicose, fonte de carbono de fácil assimilação, as bactérias podem gerar maior quantidade de energia (pela via glicolítica, Figura 3.3), aumentando a massa celular com mais rapidez, devido à grande disponibilidade de carbono e nitrogênio. Esta massa celular, maior em concentração, pode ter promovido a maior liberação de proteases no meio, levando aos extratos com maior atividade proteolítica determinada.

A proposta acima é ratificada pela composição química dos resíduos utilizados no preparo dos meios. No planejamento de misturas (capítulo 6), os meios com maior teor de açúcar redutor presente, 1,64% ou 0,89%, referentes às formulações com *trub* quente (experimentos E2 PMFL, E4 PMFL e E6 PMFL, Tabela 6.2), provavelmente não foram suficientes para aumento da massa celular. Enquanto que no planejamento fatorial, o emprego de maiores quantidades de açúcar induziu maior atividade proteolítica (experimentos E1 PFFL e E3 PFFL, Tabela 7.3).

7.3.2 Efeito de bloco

Em comparação ao melhor resultado obtido no capítulo 6 (E3 PMFL, 4% proteína de LRC), a suplementação com glicose (E1 PFFL, E5 PFFL e E6 PFFL) parece não ter surtido efeito sobre a atividade proteolítica. Contudo, esta análise é errônea, devido aos efeitos de bloco,

principalmente pelo efeito do fator inóculo, que não foi objetivo deste estudo. Adicionalmente, deve ser considerado que as condições experimentais entre os dois planejamentos foram diferentes, já que não se contemplou ensaio sem glicose na modelagem (o menor valor foi 1%).

Neste contexto, foi realizado novo experimento nas mesmas condições extrínsecas e partindo de um mesmo inóculo, para meios formulados com 4% de proteína de LRC (E3 PMFL) e na condição otimizada de LRC (7% proteínas) e glicose (7%) pelo planejamento fatorial (E1 PFFL). Assim, foi possível calcular o efeito de bloco associado às diferenças experimentais obtidas, cujo resultado é indicado na Tabela 7.6.

Tabela 7.6: Efeito de bloco

Experimento*	Atividade Proteolítica (U/mL)		Inóculo (DO_{480})		Efeito de Bloco
	1ª Produção	2ª Produção**	1ª Produção	2ª Produção**	
E3 PMFL	2,0	2,8	0,394	0,332	0,8
E1 PFFL	1,8	4,6	0,791	0,332	2,8

*PMFL: planejamento de misturas (4% de proteína de LRC); PFFL: planejamento fatorial (7% proteína de LRC e 7% de glicose);
*2ª produção refere-se à repetição dos experimentos simultaneamente, partindo-se de um mesmo inóculo.

Pode-se observar que o efeito de bloco foi mais expressivo para o experimento E1 PFFL. Este efeito pode estar associado às diferentes concentrações celulares empregadas como inóculo, mencionando ainda que as células se encontravam em diferentes estágios de atividade metabólica (início e final da fase exponencial). Constata-se que as células mais ativas (no início da fase exponencial), mesmo que em menor quantidade, tiveram melhor desempenho na produção de proteases extracelulares.

7.3.3 Produtividade de atividade proteolítica

As atividades proteolíticas dos extratos brutos obtidos nos ensaios E3 PMFL (4% proteína de LRC) e E1 $PFFL_{modif}$ (6% de proteína de LRC e 6% de glicose), determinadas para tempos de 3 e 6 horas de fermentação, são apresentadas na Tabela 7.7. Para estes valores, foi realizado o teste de Tukey de comparação de médias e calculadas as produtividades.

Tabela 7.7: Atividades proteolíticas dos extratos brutos e produtividade

Experimento	3h	6h

	A_P (U/mL)	Q_{PAP} (U/mL.h)	A_P (U/mL)	Q_{PAP} (U/mL.h)
E3 PMFL	2,6[a]	0,85	2,8[a]	0,46
E1 PFFL$_{modif}$	4,9[a]	1,63	4,6[a]	0,78

Letras sobrescritas iguais na mesma linha correspondem a valores estatisticamente iguais, a 5% de significância.
PMFL: Planejamento de misturas para fermentação láctica; PFFL$_{modif}$: Planejamento fatorial para fermentação láctica modificado; A_P: Atividade proteolítica; Q_{PAP}: Produtividade de atividade proteolítica.

É possível observar que os extratos de ambos os experimentos atingiram seus valores máximos de atividade proteolítica já no tempo 3 horas, segundo o teste de Tukey, indicado pela mesma letra 'a' sobrescrita nos valores determinados. Neste intervalo de tempo, comparativamente, o extrato E1 PFFL$_{modif}$ apresentou os melhores resultados, sendo a produtividade cerca de duas vezes maior.

7.3.4 Purificação e recuperação de proteases

Após separação das proteínas do extrato bruto E1 PFFL$_{modif}$, que gerou os maiores valores de atividade proteolítica e de produtividade, foi realizada nova determinação desta atividade enzimática, obtendo-se o valor de 145,5 U/g de precipitado proteico seco. Vale ressaltar que este resultado foi comprometido já que a recuperação seguiu procedimentos operacionais básicas. Portanto, em condições otimizadas, poder-se-ia alcançar aumento considerável deste valor.

7.3.5 Discussão dos resultados

Nesta seção apresenta-se uma análise comparativa dos resultados obtidos com dados da literatura para produção de proteases. Distintamente da discussão apresentada no Capítulo 6, que se ateve apenas à atividade proteolítica de cultivos de bactérias lácticas, será feito um detalhamento mais amplo considerando diversas espécies microbianas, diferentes matérias-primas e meios de fermentação. Os Quadros 7.1 e 7.2 resumem os dados da literatura para produção de proteases, por fermentação submersa e por fermentação no estado sólido, respectivamente.

Analisando os quadros, observam-se várias publicações que compreendem diversos micro-organismos como potenciais bioagentes para produção de proteases, a partir de variadas matérias-primas, incluindo rejeitos agroindustriais.

Cabe ressaltar a dificuldade de comparação entre os resultados de atividade proteolítica obtidos com dados da literatura, devido aos diferentes métodos de detecção empregados. Os métodos mais encontrados foram o da azocaseína e o da degradação da caseína com detecção de tirosina, como produto da hidrólise. Tzu-Wen, Jia-Lin e San-Lang (2012) verificaram a influência da metodologia de determinação da atividade proteolítica sobre as respostas nominais, encontrando 100% de atividade relativa entre o método da caseína com detecção de tirosina e o método da azocaseína. Tal resultado permite se valer da premissa de semelhança entre estas metodologias e, consequentemente, comparar os resultados com os trabalhos referendados nos quadros 7.1 e 7.2, que utilizaram uma destas duas metodologias.

Como pode ser observado nos dois quadros, a composição dos meios e os micro-organismos utilizados, apresentaram forte influência sobre as atividades proteolíticas obtidas, variando estas respostas de cerca de 55 a 1000 U/mL, para fermentação submersa, e entre 41 e 4035 U/g, para fermentação no estado sólido. No caso da fermentação submersa, o maior valor de produtividade (linha 10, Quadro 7.1), que se destaca em relação aos demais, foi encontrado para o cultivo de um micro-organismo geneticamente modificado em meio sintético. Para a fermentação no estado sólido, a maior produtividade (linha 6, Quadro 7.2) corresponde ao extrato purificado por diálise e cromatografia, após a precipitação com sulfato de amônio.

Comparativamente, no presente trabalho, foram obtidos baixos valores de atividade. No entanto, deve ser considerado que nos quadros foram compilados resultados de máxima produtividade encontrada após uma série de planejamentos e otimizações, que incluem não apenas formulações do meio, mas também condições como pH, T, agitação, estratégias de recuperação/purificação, inóculo, etc. Vale notar, ainda, os longos tempos de fermentação, sendo o menor deles pelo menos 10 vezes maior que o do presente trabalho, para um micro-organismo geneticamente modificado (linha 10, Quadro 7.1). Para os demais trabalhos, o menor tempo foi de 44 horas, cerca de 15 vezes maior que o tempo aqui despendido, e empregando meio sintético (linha 7, Quadro 7.1). Para meios formulados contendo apenas resíduos como fonte exclusiva de nitrogênio, o menor tempo de fermentação foi de 72 h (linha 2, Quadro 7.1).

Neste contexto, a máxima produtividade de atividade proteolítica, de 1,63 U/mL.h, pode ser considerada satisfatória, já que quando empregados resíduos agroindustriais, fortemente suplementados, foram alcançados valores entre 2,4 e 2,8 U/mL.h, para extratos parcialmente purificados (Quadro 7.1).

É possível, ainda, fazer uma correlação da atividade enzimática obtida com a massa de resíduo LRC utilizada, permitindo a comparação com resultados da literatura para fermentação no estado sólido (FES). Na melhor condição ensaiada (E1 $PFFL_{modif}$) foi obtida produtividade de 12,4 U/h.g LRC, valor maior ao encontrado em trabalhos recentes que também empregaram resíduos, embora enriquecidos (Quadro 7.2).

Pode-se inferir que os resultados obtidos são relevantes, considerando questões como: o uso exclusivo de resíduos como fonte de nitrogênio; o uso de bactérias lácticas, geralmente reconhecidas como seguras (GRAS – *generally recognized as safe*); e o curto tempo de fermentação. Atente-se que tão somente a suplementação com glicose, com ajuste do teor proteico, permitiu praticamente dobrar a produção e produtividade de proteases (Tabela 7.7). Ainda considerando que o emprego de meios ricos favorece a síntese de proteases (Quadros 7.1 e 7.2), uma estudo mais aprofundado dos elementos nutricionais poderia incrementar a atividade proteolítica.

Quadro 7.1: Resumo de trabalhos da literatura sobre produção de proteases

	Meio	Micro-organismo	Fontes de C e N (g/L)	AP_{max} (U/mL)	T_f (h)	Q_{PAP} (U/mL.h)	Referência
1	FP + CAS	*B. megaterium*	10 + 10 (FP +CAS);	55	-	-	Dincer et al, 2014
2	FS	*B. licheniformis* (imobilizado)	60 (GLI); 20 (FS);	177	72	2,4	Magsoodi et al, 2013
3	Resíduos/ sintético	*B. cereus*	10 (FT, FA, FM, FC, casca de arroz); 5 (GLI, FRU, LAC, SAC, AM ou MAN); 10 (PPT+EL, TG, TM, TS, TA, Ur, GEL, CAS ou $(NH_4)_2SO_4$);	180*	72	2,5	Bajaj, Sharma e Singh, 2013
4	Sintético	*B. subtilis*	10 (GAL, SAC, MALT, XY ou AM); 5 (CAS); 5,5 (PPT, $(NH_4)_2$ NO_3, $(NH_4)_2SO_4$, Ur, NH_4Cl)	236*	72	3,3	Pant et al, 2014
5	Resíduos/ sintético	*Microbacterium*	10 (CAS, GEL, soja, farinha de penas, EL ou SL);	270	96	2,8	Thys et al, 2006
6	Sintético	*P. aeruginosa*	10 (GLI, FRU, LAC, SAC, MALT); 10 (PPT, EL, EC, NH_4Cl, $(NH_4)_2SO_4$ ou Na_2NO_3)	349*	48	7,3	Raj et al, 2012
7	Sintético	*B. licheniformis*	0,6 (GLI); 4,7 ($(NH_4)_2HPO_4$);	390	44	8,9	Çalik et al, 2002
8	Meio marinho	*Marinebacter*	5 (GLI, FRU, LAC, SAC, MALT, XY ou AM) 10 (CAS, PPT, SL, EC, K_2NO_3, Na_2NO_3, NH_4Cl)	487	72	6,8	Kumar, Ananthan e Prabhu, 2014
9	Resíduos/ sintético	*B. alcalophilus*	10 (ARA, GLI, LAC, SAC, XY, glicerol); 10 (FT, FA, BG); 10 (CAS, GEL, PPT, TRIP, EL, EC, leite, FM, FS, etc.)	548*	48	11,4	Rathod e Pathak, 2014
10	Sintético	*B. licheniformis* (recombinante)	2 a 20 (GLI); 2 a 10 (PPT);	1000	32	31,3	Lin et al, 2014
11	LRC	*L. delbruecki* subsp. *delbruecki*	60 (glicose); 60 (proteína de LRC)	4,9	3	1,63	**Presente trabalho**

AP_{max} = atividade proteolítica máxima (da melhor condição experimental ou após otimizações); Tf = tempo de fermentação; Q_{PAP} = produtividade de atividade proteolítica; Referências dispostas em ordem crescente de AP_{max}.
Fontes de Carbono: GLI = Glicose; XY = xilose; LAC = lactose; SAC = sacarose; FRU = frutose; ARA = arabinose; GAL = galactose; MALT = maltose; MAN = manose; AM = amido; FT = farelo de trigo; FA = farelo de arroz; FM = farelo de milho; FC = farelo de cevada; FP = farinha de pão;
Fontes de nitrogênio: EL = extrato de levedura; EC = extrato de carne; PPT = peptona; TRIP = triptona; CAS = caseína; GEL = gelatina; SL = soro de leite; FS = farinha de soja; TG = torta de gergelim; TM = torta de mostarda; TA = torta de algodão; Ur = ureia;
*Trabalhos em que o extrato foi purificado por precipitação com sulfato de amônio, diálise e/ou cromatografia.

Quadro 7.2: Resumo de trabalhos da literatura sobre produção de proteases por fermentação no estado sólido (FES)

	Meio	Micro-organismo	Fontes de C e N extras (g/L)	AP_{max} (U/g res)	T_f (h)	Q_{PAP} (U/h.g res)	Referência
1	FT, FS e SA	*A. oryzae*	0 a 20 (GLI); 0 a 50 (AM) 0 a 20 (PPT ou EL)	41*	48	0,85	Castro e Sato, 2014
2	FT, FS e SA	*A. oryzae*	-	58,87	48	1,23	Castro e Sato, 2013
3	FT, FS e SA	*A. niger*	-	186,42*	96	1,94	Castro, Nishide e Sato, 2014
4	Bagaço de tomate	*A. oryzae*	FT, CAS, $(NH_4)_2$ NO_3	2253	96	23,47	Belmessikh et al, 2013
5	Semente *Jatropha curcas*	*A. oryzae*	-	3094	96	32,23	Thanapimmetha et al, 2012
6	Esterco e cascas de banana e maçã	*B. cereus*	GLI, TREA, MALT, XY ou AM GEL, PPT, EL, Ur, CAS ou $(NH_4)_2$ NO_3	4035*	72	56,04	Vijayaraghavan, Lazarus e Vincent, 2014
7	LRC	*L. delbruecki* subsp. *delbruecki*	60 (glicose); 60 (proteína de LRC)	37,2	3	12,4	**Presente Trabalho**

AP_{max} = atividade proteolítica máxima (da melhor condição experimental ou após otimizações); Tf = tempo de fermentação; Q_{PAP} = produtividade de atividade proteolítica; Referências dispostas em ordem crescente de AP_{max}.
Fontes de Carbono: GLI = Glicose; XY = xilose; TREA = trealose; MALT = maltose; AM = amido; FT = farelo de trigo;
Fontes de nitrogênio: EL = extrato de levedura; EC = extrato de carne; PPT = peptona; CAS = caseína; GEL = gelatina; FS = farinha de soja; Ur = ureia; SA = semente de algodão;
*Trabalhos em que o extrato foi purificado por precipitação com sulfato de amônio, diálise e/ou cromatografia.

7.4 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que:

- O fator concentração de proteínas apresentou maior efeito sobre a atividade proteolítica, embora o aumento da concentração de glicose também tenha levado a um aumento desta resposta;
- O modelo obtido para a atividade proteolítica apresentou bom ajuste para toda a região estudada pelo planejamento fatorial;
- A reprodução dos experimentos que geraram as melhores respostas de atividade proteolítica permitiu observar significativo efeito de bloco, principalmente associado ao fator inóculo, não estudado no presente trabalho;
- Observou-se que já no tempo de 3 horas de fermentação a atividade proteolítica já havia atingido seu valor máximo, aumentando a produtividade em 100% em relação ao tempo de 6 horas, tomado como base pelas conclusões do capítulo anterior;
- Na melhor condição experimental, cujo meio de fermentação apresentou em sua composição 6% de proteínas e 6% de glicose, foi obtido um extrato bruto com atividade proteolítica de 4,9 U/mL, que após precipitado, por adição de etanol, e filtrado, gerou um concentrado proteico de atividade 145,5 U/g.

Capítulo 8

Produção de mostos cervejeiros

Este capítulo visa a aplicação do extrato proteolítico produzido neste trabalho, na produção de mostos cervejeiros, que serão submetidos à fermentação, em escala de laboratório. Estas etapas, bem como, as análises físico-químicas dos mostos e das cervejas obtidas, foram realizadas nas dependências do Instituto Federal do Rio de Janeiro (IFRJ), *campus* Rio de Janeiro, nos laboratórios de Tecnologia das Fermentações e Físico-química de Alimentos.

O desenvolvimento da metodologia analítica baseada em eletroforese capilar para caracterização dos mostos doces foi realizada no Laboratório de Química Analítica Fundamental e Aplicada (LaQAFA) da Universidade Federal Fluminense (UFF), pela aluna de doutorado Renata Corrêa de Carvalho, sob supervisão da profa. Flávia F. de Carvalho Marques.

8.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir cervejas diferentes a partir de um planejamento fatorial;
- Caracterizar os mostos doces obtidos quanto ao: °Plato, extrato, teor de nitrogênio total e teor de aminoácidos (FAN);
- Caracterizar as cervejas obtidas quanto: ao extrato real, ao teor alcoólico, à eficiência da fermentação, ao teor de nitrogênio total e à massa de matéria coagulável.

8.2 MATERIAIS E MÉTODOS

8.2.1 Água

Para a produção dos mostos cervejeiros, foi utilizada água da rede de fornecimento estadual, filtrada em carvão ativado para remoção de cloro e outros interferentes, tornando-a apta para consumo e própria para produção de cerveja.

8.2.2 Malte

Para a elaboração dos mostos cervejeiros foi utilizado malte tipo Pilsen (Figura 8.1A) (Agromalte®, da Maltaria Agrária) por ser este o mais utilizado pelas cervejarias como base para diversas formulações de cerveja.

8.2.3 Lúpulo

Foi empregado lúpulo na forma de *pellets* (Figura 8.1B), adicionado apenas uma vez, ao início da cocção. O lúpulo utilizado (Hallertau Perle, HGV®, Alemanha), continha 9,7% de α-ácidos.

8.2.4 Levedura cervejeira

Para fermentação do mosto cervejeiro foi utilizada levedura de baixa fermentação, *Saccharomyces uvarum* (W-34/70, Fermentis®, França), na forma liofilizada (Figura 8.1C).

Figura 8.1: Matérias-primas e bioagente.
(A) grãos de malte; (B) lúpulo em *pellets*; (C) levedura cervejeira liofilizada.

8.2.5 Extrato proteolítico

Foi utilizado o extrato proteolítico parcialmente purificado (por precipitação com etanol, Figura 8.2) obtido neste trabalho (Capítulo 7).

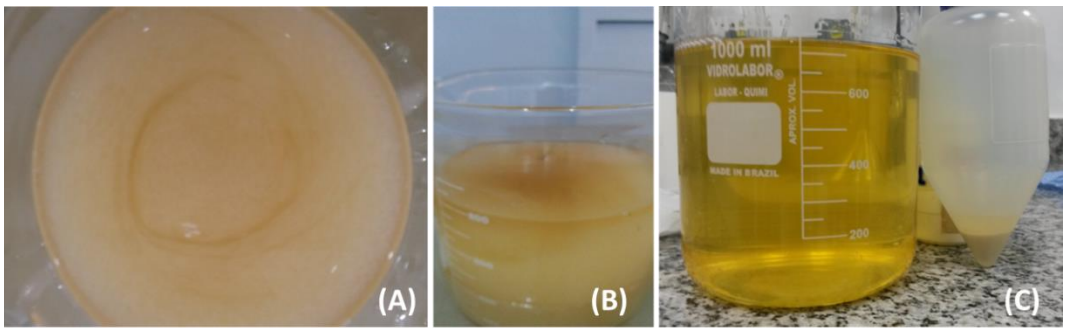

Figura 8.2: Purificação do extrato proteolítico por precipitação com etanol.
(A) e (B) homogeneização após adição de etanol PA; (C) extrato após centrifugação.

8.2.6 Produção de mostos cervejeiros e fermentação

Nesta etapa, foi verificada a influência da suplementação com extrato proteolítico obtido (Item 8.2.5) na mostura, bem como a supressão do pousio de atividade de proteases. Foram produzidos quatro mostos cervejeiros seguindo um planejamento experimental fatorial de dois níveis e dois fatores (Tabela 8.1). O primeiro fator definido, qualitativo, foi a condução da mostura sem ou com degrau proteolítico, que consistiu em dois períodos de pousio, a 45 e a 55°C, 15 minutos cada. Na ausência do degrau proteolítico, semelhante à prática usual adotada pelas grandes indústrias cervejeiras, a temperatura foi elevada diretamente, sem pausa. O segundo fator, também qualitativo, foi a adição ou não de uma quantidade fixa de extrato proteolítico. Foi empregada a dosagem de 0,75 U/g de malte utilizado, valor máximo possível disponível para uso.

Tabela 8.1: Planejamento experimental para produção dos mostos cervejeiros

Experimento	Degrau proteolítico		Extrato enzimático
	T (°C)	t (min)	
C1	45	15	Com (+)
	55	15	
C2	-		Com (+)
C3	45	15	Sem (-)
	55	15	
C4	-		Sem (-)

A obtenção dos mostos cervejeiros foi realizada em escala de laboratório, bécher de 2 L de capacidade, imerso em banho de aquecimento (NOVA ÉTICA), e acoplado à agitador de hélice com regulagem de rotação (Fisatom, 713D) para homogeneização do meio (Figura 8.3). A mostura foi conduzida de acordo com parâmetros operacionais a partir de uma compilação de dados de literatura científica (DRAGONE e SILVA, 2010; PRIEST e STEWART, 2006; BRIGGS et al, 2004; BAMFORTH, 2003; LIMA et al, 2001; KUNZE, 1999), conforme descrito a seguir.

Figura 8.3: Mostura em escala de laboratório.

O meio de mostura consistiu de mistura cereal:água na proporção de 1:4 (m/v), obtida pela adição de 200 g de malte Pilsen, moído em moinho de discos, a 0,8 L de água previamente aquecida a 35°C. A mistura foi enriquecida com cloreto de cálcio (0,125 g/L), com a finalidade de promover a estabilização enzimática, particularmente a estabilidade térmica da α-amilase, e o pH, medido em pHmetro (PHTEK, modelo PHS-3B), ajustado para faixa entre 5,2 e 5,4, pela adição de ácido láctico P.A., quando necessário.

Resumidamente, a Figura 8.4 apresenta as curvas de mosturação com os seus respectivos degraus e rampas de aquecimento. Após o arrio do malte em água e adição do extrato proteolítico, a temperatura de 35°C foi mantida por 10 minutos, visando à

solubilização do material solúvel presente no malte. Em seguida, deu-se início às rampas de aquecimento, com taxa de elevação da temperatura de aproximadamente 1°C/minuto, até que fosse atingida a temperatura do próximo degrau escolhido. As temperaturas trabalhadas compreendem 45 e 55°C para atuação de proteases, 66°C para atuação da β-amilase e 72°C para atuação da α-amilase. Os tempos de atuação de cada grupo enzimático são indicados na Figura 8.4.

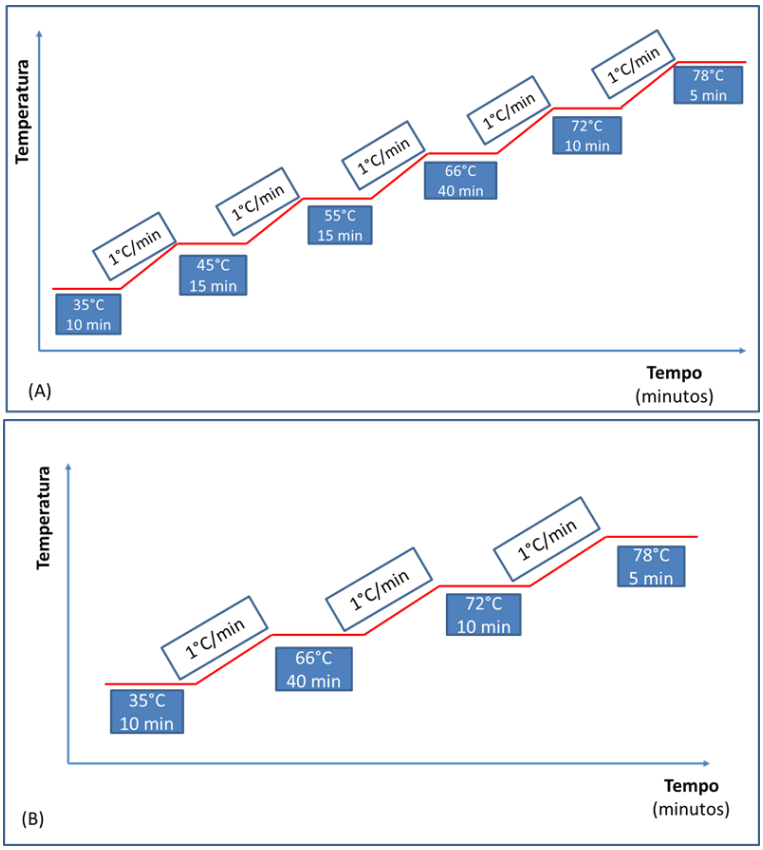

Figura 8.4: Curvas de mostura
(A) Com degrau proteolítico; (B) sem degrau proteolítico.

O *mashout* foi estabelecido em função do teste de iodo (solução alcoólica de iodo em iodeto de potássio 2%), quando foi considerado o desaparecimento da coloração roxa intensa (que caracteriza a presença de amido no meio) e surgimento de coloração amarelada, típica da solução de iodo. Para fins demonstrativos, antes de cada degrau, ao longo de toda a curva de mostura, foi realizado o teste de iodo. Após o degrau de atuação da α-amilase, a temperatura foi elevada para 78°C, para inativação das enzimas presentes e para facilitar a extração dos compostos do resíduo sólido na etapa seguinte (clarificação).

Após a mostura, o mosto foi clarificado com auxílio de fundo falso perfurado (0,6 – 0,7 mm), pelo qual o líquido foi recirculado por aproximadamente 5 minutos, com retenção do bagaço de malte e formação de torta filtrante adequada (Figura 8.5), a fim de se obter a limpidez desejada, observada visualmente. O bagaço foi lavado com água secundária aquecida a 78°C, na proporção de 1:1 em relação à água primária, ou seja, 1,6 L, antes que se esgotasse a primeira fração líquida, para evitar oxidação dos compostos do meio, principalmente lipídeos.

Figura 8.5: Bagaço de malte retido durante a clarificação do mosto doce.

Em seguida, o mosto obtido foi submetido à cocção em placas de aquecimento (Figura 8.6) por 60 min., de forma que a perda de água por evaporação fosse entre 10 e 20% (v/v). Programou-se a obtenção de mosto de apronte com 9°Plato e 12 BU, que caracterizam uma típica cerveja *American Light Lager*. Durante a cocção, foi feita a lupulagem, pela adição de lúpulo de aroma/amargor (Hallertau Perle, 9,7% α-ácidos), fervido por 60 min., A massa de lúpulo adicionada foi calculada em função do volume de mosto fervido, do amargor desejado (12 BU) e do percentual de α-ácidos presente no lúpulo em *pellets.* Segundo a tabela de Klopper[4], para obtenção de 12 BU, são necessários 19 mg/L de iso-α-ácidos. Para tanto, foi considerada uma eficiência de 30% de isomerização dos compostos de amargor durante a fervura. Para cada litro de mosto foram adicionados 0,42 g de lúpulo.

Após o período de cocção, o aquecimento foi interrompido e promoveu-se a deposição do coagulado proteico, *trub* quente (Figura 8.7-A) por forte agitação manual em

[4] A tabela de Klopper apresenta a equivalência teórica entre as concentrações de α-ácidos adicionados ao mosto e o amargor (em BU) gerados na bebida.

movimentos circulares, para atuação da força centrípeta, reproduzindo o efeito do equipamento adotado na prática industrial (*whirlpool*).

Figura 8.6: Cocção dos diferentes mostos elaborados.

Após a remoção do *trub* quente, em filtro de papel (Figura 8.7-B), o mosto foi resfriado, teve seu extrato ajustado para 9°Plato e inoculado com a levedura cervejeira liofilizada, na concentração de 1 g/L, recém hidratada em 10 mL de água fria e estéril para cada grama de fermento. A fermentação foi conduzida em frascos tipo Erlenmeyers (Figura 8.7-C) por 6 dias em temperatura de aproximadamente 15°C (estufa incubadora CALTECH, EI-08A-F). Após este tempo, a massa de leveduras foi removida e a cerveja verde maturada por 7 dias em baixas temperaturas (4°C).

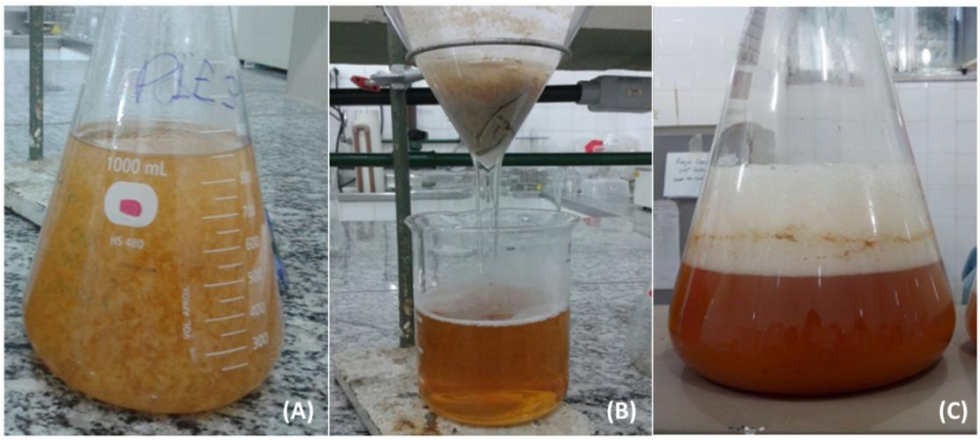

Figura 8.7: Produção da cerveja.
(A) mosto amargo com *trub* quente; (B) remoção do *trub* quente por filtração; (C) fermentação.

8.2.7 Determinações analíticas

Os mostos doces obtidos foram submetidos às seguintes análises:

- °Plato (por refratometria);
- Extrato[1]*;
- Nitrogênio total (método de Kjeldahl[2]);
- FAN – *free amino nitrogen* (método da ninhidrina[3]);

Adicionalmente, os mostos doces tiveram seu perfil de aminoácidos caracterizados por eletroforese capilar. Os estudos iniciais foram conduzidos em capilar de sílica fundida de 60 cm de comprimento total (L_{tot}) (51,5 cm até o detector - L_{ef}) e 50 µm de diâmetro interno (d.i.), devidamente adaptado ao alinhador e ao cassete que protege o capilar. O comprimento de onda utilizado para detecção foi 195 nm, o potencial aplicado durante as corridas foi de 20 kV e a temperatura mantida constante em 20 °C. As amostras foram introduzidas pelo modo hidrodinâmico com pressão de 50 mbar durante 15 s.

As cervejas foram submetidas às análises de:

- Determinação do teor alcoólico*
- Extrato Real[4]*
- Eficiência da fermentação*
- Nitrogênio total (método de Kjeldahl);
- FAN – *free amino nitrogen* (método da ninhidrina[5]);
- Massa de matéria coagulável[6];

Todas as análises assinaladas com asterisco (*) foram realizadas em equipamento específico (Alcolyzer Beer ME, Anton Paar, DMA 4500M), disponibilizado pelo IFRJ. Para as análises realizadas em duplicatas, foi realizado o teste de Tukey para comparação de médias.

---

[1] Corresponde ao % m/m de sólidos dissolvidos.
[2] AOAC, 1975.
[3] EBC, 1987; ASBC, 1976.
[4] Corresponde ao % m/m de sólidos dissolvidos considerando-se a alteração de densidade causada pela presença de etanol.
[5] EBC, 1987; ASBC, 1976.
[6] Após fervura (por 2h), e filtração da massa coagulada.

8.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 8.8-A apresenta os testes de iodo realizados após o degrau de 35°C para os 4 mostos produzidos. Os resultados foram comparados pelos pares das amostras, C1/C3 e C2/C4, que diferem entre si pela adição do extrato de proteases; o primeiro par difere do segundo pela manutenção do degrau proteolítico durante a mostura. As amostras dos mostos C1 e C2 apresentam coloração ligeiramente mais escura do que as amostras C3 e C4, respectivamente. O amido (mais especificamente sua fração de amilose) tem capacidade de complexar o iodo em sua estrutura tridimensional, formando um complexo de coloração azul escura/roxa intensa. Pode-se dizer, então, que a adição de enzimas proteolíticas teve efeito sobre a liberação da fração amilácea para o meio.

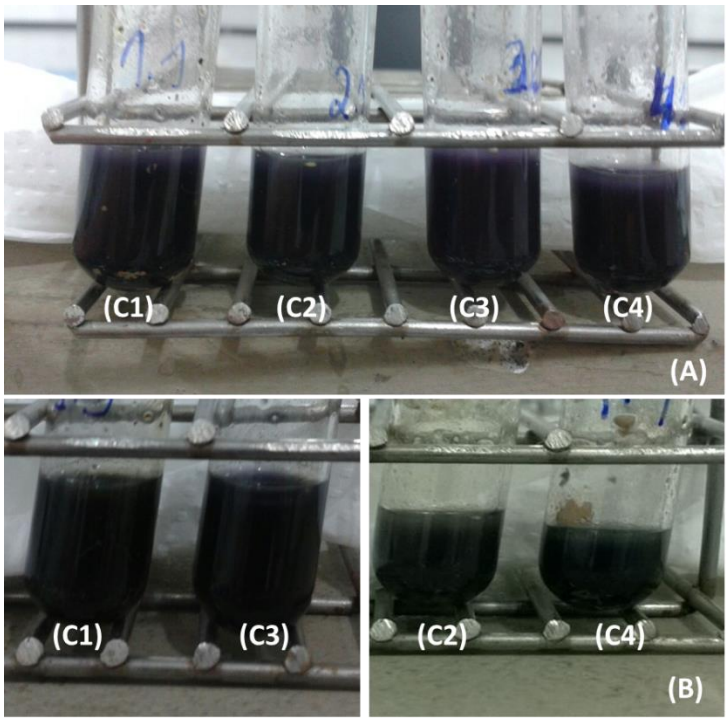

Figura 8.8: Teste de iodo nos diferentes meios de mostura
(A) após degrau 35°C; (B) após degrau de 66°C; (C1) com degrau e extrato; (C2) sem degrau e com extrato; (C3) com degrau e sem extrato; (C4) sem degrau e sem extrato.

Esta hipótese é corroborada pelo conhecimento e detalhamento da estrutura do grão do malte de cevada. Sabe-se que na parte interna do grão localiza-se o endosperma amiláceo, como reserva energética, aprisionado em uma matriz proteica, rica em hordeínas (proteínas estruturais insolúveis), envolta por uma tripla camada, também proteica, chamada aleurona (LEWIS e YOUNG, 2001; HUGHES, 1996). Durante a mostura, a proteólise

consiste principalmente na quebra destas moléculas proteicas, de forma que a supressão dos degraus proteolíticos (45 e 55°C) acarreta em reduzida atuação nesta fração, e consequentemente menor exposição da fração amilácea. Desta maneira, pode-se inferir que as proteases adicionadas ao meio de mostura promoveram maior ação sobre a fração proteica do grão.

A Figura 8.8-B apresenta o teste de iodo realizado após o degrau de 66°C, para os diferentes mostos preparados. Os tubos contendo os mostos C1 e C2 apresentaram coloração roxa menos intensa (ou mais amarelada) que os tubos com as amostras dos mostos C3 e C4, respectivamente. A degradação do amido em sacarídeos de baixa massa molar resulta em alteração da coloração da amostra, que tende para a cor amarelada, natural do iodo. Aparentemente, a adição de enzimas proteolíticas exógenas (C1 e C2) e, consequente, maior exposição da fração amilácea concorreu para uma mais eficiente e rápida hidrólise do amido. Observa-se, ainda, que a adição de proteases exógenas teve mais efeito quando não realizado o degrau proteolítico, evidenciado pela análise visual do par C2/C4 em comparação ao par C1/C3.

Os parâmetros avaliados para caracterização dos mostos doces obtidos são apresentados na Tabela 8.2, sendo os dados do teor de nitrogênio total (N_{total}) e de aminoácidos (FAN) analisados pelo teste de Tukey de comparação de médias.

A adição de proteases durante a mostura promoveu ligeiro aumento do extrato, medido em Alcoolyzer, e do °Plato medido por refratometria, do mosto doce C2 em relação ao mosto doce C4 (Tabela 8.2). Este resultado corrobora a hipótese de que uma maior atividade proteolítica no meio de mosturação favorece maior liberação das frações de amido, que, por sua vez, se apresentaram mais disponíveis para atuação das amilases. Entretanto, pouca diferença foi observada entre os extratos do par C1/C3, indicando que a adição do extrato proteolítico exógeno teve maior efeito quando os mostos não foram submetidos ao degrau de proteases (do malte) durante a mostura.

No que tange ao teor de açúcares redutores não houve variação expressiva, estando os valores compreendidos na faixa de 5 a 5,5% (m/v), por isso os dados não participaram na compilação da tabela. Provavelmente, isto decorreu do prolongado tempo de atuação da β-amilase (40 minutos), enzima principal responsável pela geração de açúcares redutores a

partir da hidrólise das frações amiláceas. Portanto, a suplementação com enzimas proteolíticas apresentou pouco efeito sobre a disponibilidade de açúcares fermentescíveis.

Em geral, para as indústrias cervejeiras, o teor de extrato tem mais relevância que o teor de açúcares redutores, por ser a medida empregada nos cálculos de rendimento e eficiência da mostura. Além disto, tem efeito sobre importantes características sensoriais da cerveja, principalmente no que diz respeito aos aspectos texturais.

Tabela 8.2: Caracterização dos mostos doces

Parâmetros*	**Mosto Doce****			
	C_1	**C_2**	**C_3**	**C_4**
E (% m/m)	8,4	8,8	8,5	8,3
°Plato	8,4	8,9	8,8	8,5
N_{total} (%)	$0{,}040^{2}$	$0{,}041^{a}$	$0{,}045^{1}$	$0{,}037^{b}$
FAN (mg/L)	208^{1}	330^{a}	250^{1}	212^{b}
Redução N_{total} na cocção (%)	5,4	9,6	7,1	12,5

Letras e números diferentes sobrescritos na mesma linha correspondem a valores estatisticamente diferentes, a 5% de significância;
O teste foi realizado aos pares (C1/C3 e C2/C4);
*E: extrato; N_{total}: nitrogênio total; FAN: *free amino nitrogen* (equivalentes de glicina);
**C1: com degrau e extrato; C2: sem degrau e com extrato; C3: com degrau e sem extrato; C4: sem degrau e sem extrato.

Para o teor de nitrogênio total, observa-se pequeno aumento, embora estatisticamente significativo (teste de Tukey, Tabela 8.2), do mosto C2 em relação ao mosto C4. Isto sugere que as proteases adicionadas promoveram maior extração dos compostos nitrogenados do malte para o mosto. Mesmo com a baixa atuação das proteases sobre a fração proteica insolúvel do malte, a adição das enzimas proteolíticas promoveu alterações na composição do mosto doce, fundamentais para o perfil dos compostos nitrogenados solúveis presentes. A análise comparativa do teor de aminoácidos (*free amino nitrogen*) entre os mostos C2 e C4 mostra que o maior valor foi determinado quando houve suplementação de proteases na mostura (330 e 212 mg/L, respectivamente).

Comportamento diferenciado foi observado para o par de mostos C1/C3. Estranhamente, o mosto suplementado com o extrato proteolítico produzido neste trabalho (C1) apresentou menor teor de nitrogênio total e, particularmente, menor teor de aminoácidos que o mosto C3 (Tabela 8.2).

De modo geral, em condição de baixa disponibilidade de aminoácidos, a levedura cervejeira apresenta alterações metabólicas, o que resulta na geração de diferentes

subprodutos de fermentação (BRIGGS et al, 2004). Desta maneira, a suplementação de proteases sobre a mostura pode apresentar efeito positivo sobre a qualidade sensorial da cerveja.

Evidenciam-se, ainda, perdas diferenciadas de nitrogênio total durante a cocção dos mostos doces. Na presença de proteases exógenas (C1 e C2) houve menores perdas percentuais deste conteúdo (Tabela 8.2). Sabe-se que durante a etapa de cocção, proteínas de elevada massa molar tendem a perder água de solvatação, coagulando, além de sofrerem complexação entre si, com formação do chamado *trub* quente, insolúvel, que precipita e é removido (BARCHET, 1993). Desta maneira, a adição de enzimas proteolíticas exógenas durante a mostura pode ter promovido diminuição da massa molar das proteínas presentes, reduzindo a intensidade com que esta coagulação ocorreu em alta temperatura. Quanto menor a perda de compostos nitrogenados durante a cocção, melhor a qualidade nutricional do mosto, para a atuação da levedura cervejeira, e do produto final.

A Figura 8.9 apresenta os eletroferogramas obtidos para a caracterização dos mostos doces obtidos, cujo procedimento ainda está em fase validação. A análise dos dados preliminares indica perfis bastante semelhantes para cada par (C1/C3 e C2/C4). As principais diferenças existentes entre os mostos C2 e C4 está na área correspondente aos picos, que remete à concentração dos aminoácidos correspondentes. Observa-se que para o mosto adicionado de proteases (C2), os picos são maiores ou similares aos do mosto não adicionado de proteases (C4), corroborando os resultados obtidos para o teor de FAN (*free amino nitrogen*), apresentados na Tabela 8.2. Já entre os mostos C1 e C3, observam-se picos de mesma área ou com pequena variação; notando-se, ainda, que o mosto C3 apresenta alguns picos não detectados para o mosto C1, entre o tempo de migração de 9 e 10 min., aproximadamente. Adicionalmente, uma pequena diferença entre os perfis dos eletroferogramas dos quatro mostos pôde ser observada entre os tempos de migração de 8 e 10 min.; picos que não foram identificados na solução padrão dos aminoácidos. Vale notar, ainda, que para estas amostras o aminoácido cisteína só foi detectado no mosto C1.

Estes resultados ratificam que a adição do extrato proteolítico teve ação sobre a fração proteica do malte, seja aumentando o teor de aminoácidos e/ou outros compostos nitrogenados de baixa massa molar, ou alterando o perfil dos compostos nitrogenados como um todo.

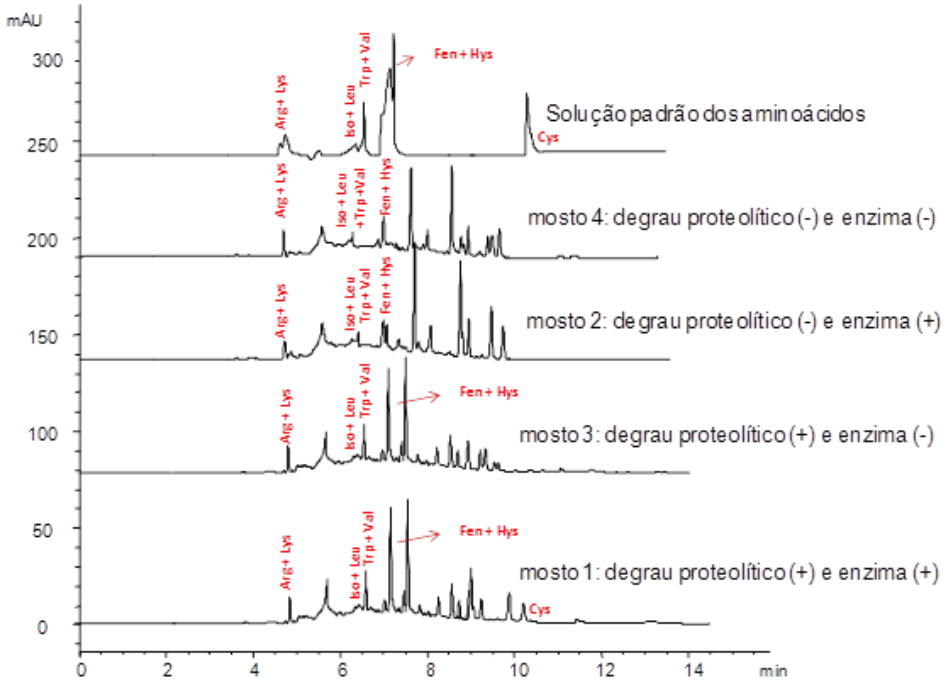

Figura 8.9: Eletroferogramas dos mostos obtidos em 195 nm.
Condições: BGE composto por tampão borato 50 mmol L^{-1} em pH 10,1, capilar de sílica fundida (L_{tot} = 60 cm, L_{ef} = 51,5 cm, d.i. = 50 µm); temperatura de 20 °C; diferença de potencial aplicada de 20 kV e injeção hidrodinâmica da amostra com pressão de 50 mbar por 15 s. (Análise realizada por Renata Correa de Carvalho).

A Tabela 8.3 apresenta os parâmetros de análises das quatro cervejas obtidas. Observa-se pequena variação entre os extratos finais, embora os teores alcoólicos tenham sido bastante semelhantes. Estes valores permitiram calcular as eficiências da fermentação, cujos maiores valores corresponderam às condições C2 (sem degrau e suplementação de enzimas) e C3 (com degrau). Adicionalmente, comparando C2 e C4, que se diferenciaram pela adição de protease exógena, obteve-se aumento da eficiência de fermentação.

Tabela 8.3: Caracterização das cervejas

Parâmetros*	**Cerveja****			
	C_1	**C_2**	**C_3**	**C_4**
Er (% m/m)	3,1	3,5	3,4	3,2
N_{total} (%)	0,027	0,020	0,028	0,025
FAN (mg/L)	118	89	121	102
Etanol (%v/v)	3,6	3,7	3,8	3,7
Massa coagulável (g/L)	4,5	4,8	5,0	6,4
Eficiência Fermentação (%)	92	98	97	91

*E = extrato; N_{total} = nitrogênio total; FAN = *free amino nitrogen* (expressos em equivalentes de glicina); Massa coagulável = massa de material coagulado após fervura por 2 horas;
**C1: com degrau e extrato; C2: sem degrau e com extrato; C3: com degrau e sem extrato; C4: sem degrau e sem extrato.

Evidencia-se correlação entre o teor de nitrogênio total e FAN, sendo os maiores valores referentes às cervejas C1 e C3, ambas obtidas de mostos sem suplementação de proteases. Entretanto, o maior consumo de aminoácidos na fermentação foi observado para a cerveja C2, obtida para a mosturação sem degrau proteolítico e adicionada de proteases.

A Tabela 8.3 indica que a maior massa de matéria coagulável por fervura foi obtida para a cerveja C4 (sem degrau e sem suplementação de proteases), seguida das cervejas C3, C2 e C1, nesta ordem, sendo as três últimas com valores bastante próximos. O material coagulável pode ser associado à coagulação de proteínas de elevada massa molar, sendo a redução de sua concentração benéfica para a estabilidade coloidal da bebida, evitando sua turvação precoce durante o período de transporte e estocagem (BAMFORTH, 2009). Portanto, os resultados obtidos, já esperados, indicam o efeito positivo, quer do degrau de proteases quer da suplementação com proteases exógenas, sobre o perfil de compostos nitrogenados presentes no mosto e na cerveja.

Alguns autores avaliaram a suplementação da hidrólise de matérias primas amiláceas com proteases comerciais, seja para a produção de bebidas ou de etanol combustível, com a obtenção de mostos de alta densidade (*high gravity*) ou mostos comuns. Seja em mostos de trigo (JONES e INGLEDEW, 1994), de sorgo (PEREZ-CARRILO et al, 2012), de milho (JOHNSTON e McALOON, 2014; KLOSOWISKI et al, 2010), ou de malte de cevada tradicional (LEI, ZHAO e ZHAO, 2013; LEI et al, 2013), foram obtidos como respostas: aumento na concentração de aminoácidos; aumento do rendimento de mostura; aumento da eficiência e da produtividade da fermentação alcoólica; e, em alguns casos, o aumento da biomassa celular ao final da fermentação.

Em suma, os resultados obtidos indicam que a adição do extrato proteolítico teve efeito sobre a fração proteica do grão, com significativas alterações das características dos mostos e das cervejas obtidas. Entretanto, sugere-se que a dosagem de proteases suplementada seja otimizada, uma vez que este não foi o objeto deste estudo.

8.4 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos foi possível concluir que:

- A adição de extrato proteolítico durante a mostura promoveu aumento do extrato, do teor de nitrogênio total e do teor de aminoácidos no mosto doce, além da redução da perda de nitrogênio durante sua cocção;
- Foram observadas diferenças nos eletroferogramas obtidos para cada mosto, indicando alterações no perfil de aminoácidos presentes e, principalmente, em sua concentração;
- A cerveja obtida a partir do mosto adicionado do extrato proteolítico apresentou maior eficiência de fermentação e redução da massa de matéria coagulável após fervura.

Estes resultados indicam o potencial de aplicação do extrato proteolítico obtido a partir da fermentação láctica dos resíduos cervejeiros (Capítulos 6 e 7) no próprio processo cervejeiro, apesar de sua utilização ser possível em inúmeros processos enzimáticos da indústria de bioprocessos e alimentos.

Capítulo 9

Conclusões gerais e perspectivas futuras

9.1 CONCLUSÕES GERAIS

Com base em todos os resultados obtidos ao longo dos capítulos experimentais, foi possível concluir que:

- Os resíduos cervejeiros, bagaço de malte, *trub* quente e levedura residual, brutos apresentaram potencial para o cultivo de bactérias lácticas, sendo a formulação à base dos três resíduos combinados a que resultou nos maiores valores de acidez final e produtividade (expressas em ácido láctico).
- O meio constituído exclusivamente de levedura residual cervejeira (LRC) apresentou o melhor resultado para a atividade proteolítica do extrato bruto;
- A atividade de proteases foi favorecida pela adição de glicose ao resíduo cervejeiro LRC, embora estatisticamente tenha sido comprovada a maior influencia do teor proteico sobre esta resposta.
- A condição que resultou em máxima atividade proteolítica, de 4,9 U/mL em três horas de fermentação, foi 6% de glicose e 6% de proteína total proveniente de LRC;
- A purificação parcial do extrato proteolítico bruto por precipitação com etanol seguida de filtração em membrana gerou concentrado enzimático de atividade proteolítica de 145,5 U/g.
- O emprego do extrato proteolítico obtido na produção de cerveja apresentou resultados relevantes, como: aumento do extrato no mosto doce; aumento do teor de nitrogênio total e de aminoácidos; alteração do perfil e menor perda de compostos nitrogenados durante a cocção do mosto; aumento da eficiência da fermentação e redução do teor de matéria coagulável no produto final.

9.2 PERSPECTIVAS FUTURAS

- Avaliar parâmetros de fermentação láctica para obtenção do extrato proteolítico a partir do resíduo cervejeiro;
- Verificar fontes alternativas de baixo custo para fornecimento de açúcar fermentescível ao meio contendo LRC, em substituição à glicose;
- Definir condições ótimas de pH e temperatura para atuação do extrato de proteases;
- Caracterizar a bioquímica do processo de hidrólise pelo extrato proteolítico;
- Avaliar procedimentos de recuperação e purificação das enzimas;
- Avaliar a dosagem de suplementação de proteases durante a mosturação.

Capítulo 10

Referências

ABASIEKONG, S. F. Effects of fermentation on crude protein content of brewers dried grains and spent sorghum grains. **Bioresource Technology**, n. 35, p. 99-102, 1991.

ABDEL-RAHMAN, M. A.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits. **Journal of Biotechnology**, v. 156, p. 286-301, 2011.

ABRAHAM, J.; GEA, T.; SANCHEZ, A. Potential of the solid-state fermentation of soy fibre residues by native microbial populations for bench-scale alkaline protease production. **Biochemical Engineering Journal**, v. 74, p. 15-19, 2013.

ADENIRAM, H. A.; ABIOSE, S. H.; OGUNSUA, A. O. Production of fungal β-amylase and amyloglucosidase on Some Nigerian Agricultural Residues. **Food Bioprocess Technology**, n. 3, p. 693-698, 2010.

AGUIRRE, L.; GARRO, M. S.; GIORI, G. S. Enzymatic hydrolysis of soybean protein using lactic acid bacteria. **Food Chemistry**, v. 111, p. 976-982, 2008.

AIYER, P.V. Amylases and their applications. **African Journal of Biotechnology**. V. 4, n°13, p. 1525-1529, 2005.

ALBUQUERQUE, D. M. N. Resíduo desidratado de cervejaria para suínos em crescimento e terminação. **Dissertação de Mestrado** em Ciência Animal. UFPI, 2009.

AL-HAMADANY, W. S. Isolation and identification of Gram positive cocci bacterial pathogens from sappurative otitis media infections. **The Iraqi Journal of Veterinary Medicine**, v. 37, n. 1, p. 129-133, 2013.

ALIYU, S.; BALA, M. Brewer's spent grain: A review of its potentials and applications. **African Journal of Biotechnology**, v. 103, n. 3, p. 324-331, 2011.

AMITA TULI; SETHI, R. P.; KHANNA, P. K.; MARWAHA, S. S. Lactic acid production from whey permeate by immobilized *Lactobacillus casei*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 7, p. 164-168, 1985.

ANIBABA, T. S.; OSAGIE, A. U. Effect of malting on protein metabolism in two varieties of sorghum. **Journal of science and Food Agriculture**, v. 74, p. 20-24, 1997.

ANWAR, A,; SALEEMUDDIN, M. Alkaline proteases: a review. **Bioresource Technology**, v. 64, p. 175-183, 1998.

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

APHA, AWWA, WEF. **Standard Methods for the Examination of Water & Wastewater**. 21ª Ed., Washington, 2005.

AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHMIDELL, W. Biotecnologia Industrial – vol. 4. 1ª Ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. p 91-144.

ASBC. American Society of Brewing Chemists, Methods of Analysis. Wort-12 Free amino nitrogen (International Method), Ninhydrin Method. USA, 1976.

ASSIS, E. M. Polissacarídeos da parede celular de levedura de cervejaria (Saccharomyces cerevisiae), obtida por rompimento mecânico da célula e de processo industrial de autólise. **Tese de Doutorado** em Tecnologia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 1996.

BAJAJ, B. K.; SHARMA, N.; SINGH, S. Enhanced production of fibrinolytic protease from *Bacillus cereus* NS-2 using cotton seed cake as nitrogen source. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.2, p. 204-209, 2013.

BAMFORTH, C. W. **Beer A Quality Perspective**. Academic Press, 2011. 304p.

BAMFORTH, C. W. **Beer: Tap Into the Art and Science of Brewing**. 2 ed. New York: Oxford University Press, 2003. 233p.

BAMFORTH, C. W. Current perspectives on the role of enzymes in brewing. **Journal of Cereal Science**, n. 50, p. 353-357, 2009.

BAMFORTH, C.W.; MILANI, C. The foaming of mixtures of albumin and hordein protein hydrolysates in model systems. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, p. 1001-1004, 2004.

BARCHET, R. Cold Trub: Implications for finished beer and methods of removal. **Brewing Techniques**, v.2, n.2. 1994.

BARCHET, R. Hot Trub: Formation and removal. **Brewing Techniques**, v.1, n.4. 1993.

BARTOVA, V.; BARTA, J. Chemical composition and nutritional value of protein concentrates isolated from potato (*Solanum tuberosum* L.) fruit juice by precipitation with ethanol or ferric chloride. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 9028-9034, 2009.

BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 15, n. 1, p. 63-72, 2004.

BEHMER, M. L. A. **Tecnologia do Leite**, 13ª ed., São Paulo, Ed. Nobel, 1999. 285p.

BEKATOROU, A.; PSARIANOS, C.; KOUTINAS, A. A. Production of food grade yeast. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 407-415, 2006.

BELLUCO, A. E. S. Alterações fisiológicas e de composição em Saccharomyces cerevisiae sob condições não proliferantes. **Dissertação de Mestrado** em Ciência e Tecnologia de Alimentos. USP, 2001.

BELMESSIKH, A.; BOUKHALFA, H.; MECHAKRA-MAZA, A.; GHERIBI-AOULMI, Z.; AMRANE, A. Statistical optimization of culture for neutral protease production by *Aspergillus oryzae*. Comparative study between solid and submerged fermentations of tomato pomace. **Journal of The Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 44, p. 377-385, 2013.

BERNSTEIN, L.; WILLOX, J. C. **Água**. In: Broderick, H. M. El cervecero en la practica. Asociación Latinoamericana de Fabricantes de Cerveza, Lima, Peru. Cap. 4, p. 53-82, 1977.

BHATIA, S. J.; KOCHAR, N.; ABRAHAM, P.; NAIR, N. G.; MEHTA, A. P. *Lactobacillus acidophilus* inhibits growth of *Campylobacter pyroli* in vitro. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 10, p. 2328-2330, 1989.

BIAZUS, J. P. M.; SANTANA, J. C. C.; SOUZA, R. R.; TAMBOURGI, E. B. Purificação de amilases de malte de *Zea mays*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 1, p. 218-223, 2010.

BOHAK, I.; BACK, W.; RICHTER, L.; EHRMANN, M.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K. H. *Lactobacillus amylolyticus* sp. nov., isolated from beer malt and beer wort. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 21, p. 360-364, 1998.

BOMRUNGNOK, W.; SONOMOTO, K.; PINITGLANG, S.; WONGWICHAM, A. Single step lactic acid production from cassava starch by *Lactobacillus plantarum* SW14 in conventional continuous and continuous with high cell density. **APCBEE Procedia**, v. 2, p. 97-103, 2012.

BOTELHO, B. G. Perfil e teores de aminas bioativas e características físico-químicas em cervejas. **Dissertação de Mestrado** (em Ciência de Alimentos). Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, 2009.

BOULTON, C.; QUAIN, D. **Brewing Yest & Fermentation**. Blackwell Science LTD, 2001. 644p.

BRASIL. Decreto n° 6.871, de 4 de junho de 2009. Regulamenta a Lei n° 8,918 de 14 de julho de 1994, que dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. 2009.

BRASIL. MIISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Regulamentação das Definições e Processo Produtivo da Cerveja. Decreto n° 2.314, 4 de Setembro de 1997.

BRIGGS, D. E.; BOULTON, C. A.; BROOKES, P. A.; STEVENS, R. **Brewing Science and Practice**. Flórida: CRC Press LLC and Woodhead Publishing Limited, 2004. 863p.

BRUNO, L. M. Manual de curadores de germoplasma – Micro-organismos: Bactérias ácido-láticas. EMBRAPA, 2011.

BUTT, K. R. Utilization of solid paper-mill sludge and spent brewery yeast as a feed soil-dwelling earthworms. **Bioresource Technology**, n. 44, p. 105-107, 1993.

BYUNG-GON, R.; KYOCHAN, k.; JUNGMIN, k.; JONG-IN, H.; JI-WON, Y. Use of organic waste from the brewery industry for high-density cultivation of the docosahexaenoic acid-rich microalga, Aurantiochytrium sp. KRS101. **Bioresource Technology**. V. 129, p. 351-359, 2013.

CABALLERO-CORDOBA, G. M.; PACHECO, M. T. B.; SGARBIERI, V. C. Composição química da biomassa de levedura integral (*Saccharomyces* sp.) e determinação do valor nutritivo da proteína em células íntegras ou rompidas mecanicamente. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 17, n. 2, p. 102-106, 1997.

CABALLERO-CORDOBA, G. M.; SGARBIERI, V. C. Nutritional and toxicological evaluation of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) biomass and yeast protein concentrate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, p. 341-351, 2000.

CAGNO, R. D.; ANGELIS, M. D.; LAVERMICOCCA, P.; VICENZI, M. D.; GIOVANNINI, C.; FACCIA, M.; GOBBETTI, M. Proteolysis by sourdough lactic acid bacteria: effects on wheat flour protein fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerance. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 2, p. 623-633, 2002.

ÇALIK, P.; BILIR, E.; ÇALIK, G.; OZDAMAR, T. H. Influence of pH conditions on metabolic regulations in serine alcaline protease production by *Bacillus licheniformis*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 685-697, 2002.

CAMARGOS, M. A.; BARBOSA, F. V. Da fusão Antárctica/Brahma à fusão com a Interbrew: uma análise da trajetória econômico-financeira e estratégica da AmBev. **Revista de Gestão USP**, v. 12, n. 3, p. 47-63, 2005.

CANCELLARA, W. R. **Introdução à filtração de cervejas e os auxiliares filtrantes**. Revista Meio Filtrante. Ano 3, n. 10, 2004.

CARPINÉ, D.; DAGOSTIN, J. L. A. ; SANTA, H. S. D. ; ALVAREZ, D. C. ; TERRA, N. N. ; SANTA, O. R. D. Atividade proteolítica e lipolítica de bactérias lácticas isoladas de salames artesanais. **Ambiência Guarapuva**, v. 6, n. 1, p. 125-132, 2010.

CARREIRA, R. L.; SILVA, V. D. M.; JANUARIO, J. N.; AGUIAR, M. J. B.; STARLING, A. L. P.; SILVESTRE, M. P. C. Ação de fatores enzimáticos na obtenção de hidrolisados proteicos de farinha de trigo com baixo teor de fenilalanina. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 1, p. 93-98, 2009.

CARVALHO, D. S.; ZAMBIAZI, R. C. Avaliação do processo fermentativo de cerveja Pilsen pelo uso de diferentes concentrações de *Saccharomyces cerevisiae*. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 22, n. 3, p. 351-357, 2011.

CARVALHO, G. B. M.; BENTO, C. V.; SILVA, J. B. A. Elementos Biotecnológicos Fundamentais no Processo Cervejeiro: 1ª Parte – As Leveduras. **Revista Analytica**, n. 25, p. 36-42. 2006.

CARVALHO, G. B. M.; BENTO, C. V.; SILVA, J. B. A. Elementos Biotecnológicos Fundamentais no Processo Cervejeiro: 3ª Parte – A Maturação. **Revista Analytica**, n. 27, p. 69-74, 2007.

CARVALHO, G. B. M.; ROSSI, A. A.; SILVA, J. B. A. Elementos Biotecnológicos Fundamentais no Processo Cervejeiro: 2ª Parte – A Fermentação. **Revista Analytica**, n. 26, p. 46-54. 2007.

CASTRO, R. J. S.; NISHIDE, T. G.; SATO, H. H. Production and biochemical properties of proteases secreted by *Aspergillus niger* under solid state fermentation in response to different agroindustrial substrates. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, p. 1-10, 2014.

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Production and biochemical characterization of protease from *Aspergillus oryzae*: an evaluation of the physical-chemical parameters using agroindustrial wastes as supports. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 20-25, 2014.

CASTRO, R. J. S.; SATO, H. H. Synergistic effects of agroindustrial wastes on simultaneous production of protease and α-amylase under solid state fermentation using a simplex centroid mixture design. **Industrial Crops and Products**, v. 49, p. 813-821, 2013.

CELUS, I.; BRIJS, K.; DELCOUR, J. A. The effects of malting and mashing on barley protein extractability. **Journal of Cereal Science**, n. 44, p. 203-211, 2006.

CERVESIA. Mercado Cervejeiro. Disponível em www.cervesia.com.br.

CHAE, H. J.; JOO, H.; MAN-JIN, I. Utilization of brewer's yeast cells for the production of food-grade yeast extract. Part 1: effects of different enzymatic treatments on solid and protein recovery and flavor characteristics. **Bioresource Technology**, n. 76, p. 253, 258, 2001.

CHAISU, K.; CHARLES, A. L.; GUU, Y. K.; YEN, T. B.; CHIU, C. H. Optimization lactic acid production from molasses renewable raw material through response surface methodology with *Lactobacillus casei* M-15. **APCBEE Procedia**, v. 8, p. 194-198, 2014.

CHANDA, S.; CHAKRABATI, S. Plant origin liquid waste: a resource for single-cell protein production by yeast. **Bioresource Technology**, v. 57, n. 1, p. 51-54, 1996.

CHANDAN, R. C.; WHITE, C. H.; KILARA, A.; HUI, Y.H. **Manufacturing Yogurt and Fermented Milks**. 1ª ed., Blackwell Publishing Ltd, UK, 2006. 364p.

CHARNEY, J.; TOMARELLI, R.M. A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. **Journal Biology Chemistry**, v. 23, p. 501-505, 1947.

CHEN, C.; WANG, J. Removal of Pb^{2+}, Ag^{+}, Cs^{+}, and Sr^{2+} from aqueous solution by brewery's waste biomass. **Journal of Hazardous Materials**, n. 151, p. 65-70, 2008.

CHIN, P. M.; INGLEDEW, W. M. Effect of lactic acid bacteria on wheat mash fermentations prepared with laboratory backset. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 16, p. 311-317, 1994.

CLERCK, J. **Cours de brasserie**, vol I. p. 478-481. Institute Agronomique, Bélgica, 1962a.

CLERCK, J. **Cours de brasserie**, vol II. p. 608-609. Institute Agronomique, Bélgica, 1962b.

COELHO, M.A.Z.; SALGADO, A.M.; RIBEIRO, B.D. **Tecnologia Enzimática**. Editora EPUB, Petrópolis, 2008.

CORDEIRO, L. G.; El-AOUAR, A. A.; GUSMÃO, R. P. Caracterização de bagaço de malte oriundo de cervejarias. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 7, n. 3, p. 20-22, 2012.

CORNELL, J. A. **Experiments with mixtures: design models and the analysis of mixture data**. 2nd Ed., New York: John Wiley & Sons, 1990.

CORTACERO-RAMIREZ, S.; CASTRO, M. H. B. SEGURA-CARRETERO, A.; CRUCES-BLANCO, C.; FERNANDEZ-GUTIERREZ, A. Analysis of beer componentes by capillary electrophoretic methods. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 22, p. 440-455, 2003.

COSTA, A. D.; MATTOS, E. S.; LIMA, C. A. R.; VIEIRA, A. A.; MATTOS, M. A.; FERREIRA, R. A. D.; SARINHO, V. C.; RAMALHO, H. F. Composição química e energia digestível do bagaço de malte em suínos machos nas fases de crescimento e terminação. **Anais do Congresso Brasileiro de Zootecnia**, Pernambuco, 2006.

COSTA, A. G.; MAGNANI, M.; CASTRO-GOMEZ, R. J. H. Obtenção e caracterização de manoproteínas da parede celular de leveduras de descarte em cervejaria. **Acta Scientiarum**, v. 34, n. 1, p. 77-84, 2012.

CUI, F.; LI, Y.; WAN, C. Lactic acid production from corn stover using mixed cultures of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus brevis*. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 1831-1836, 2011.

CURI, W. F. **Análise de Variância – ANOVA**. Notas de aula. Universidade Federal de Campina Grande, 2008.

CUTAIA, A. J. Brewing: New Technologies. **Trends in Food Science & Technology**, n. 18, p. 496, 2007.

DAKO, E.; El SODA, M.; VUILLEMARD, J. C.; SIMARD, R. E. Autolytic properties and aminopeptidase activities of lactic acid bacteria. **Food Research International**, v. 28, p. 503-509, 1995.

DALE, C. J.; YOUNG, T. W.; BREWER, S. Amino acid analysis of beer polypeptides. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 95, p. 87-89, 1989.

De MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of Lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 23, n. 1, p. 130-135, 1960.

DENKE, M. A. Nutritional and health benefits of beer. **American Journal of Medicinal Science**, v. 320, n. 5, p. 320-326, 2000.

DE-SONG, T.; GANG-MING, Y.; YUAN-ZHE, H.; SONG-QING, H.; BING, L.; LIN, L.; HUI-LING, L.; BORTHAKUR, D. Recovery of protein from brewer's spent grain by ultrafiltration. **Biochemical Engineering Journal**, n. 48, p. 1-5, 2009.

Di CAGNO, R.; ANGELIS, M.; UPADHYAY, V.K.; McSWEENEY, P. L. H.; MINERVINI, F.; GALLO, G.; GOBBETTI, M. Effect of proteinases of starter bacteria on the growth and proteolytic activity of *Lactobacillus plantarum* DPC2741. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 145-157, 2003.

Di CAGNO.; ANGELIS, M.; LAVERMICOCCA, P.; De VICENZI, M.; GIOVANNINI, C.; FACCIA, M.; GOBBETTI, M. Proteolysis by sourdough lactic acid bacteria: effects on wheat flour protein fractions and gliadin peptides involved in human cereal intolerance. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 623-633, 2002.

DINCER, S.; OZDENEFE, M. S.; UNAL,M. U.; ARKUT, A.; MERCIMEK, H. A.; KAYIS, F. Optimization of medium components for alkaline protease production by *Bacillus megaterium* from waste breads. **Journal of Biotechnology**, v. 185 (supplement), p. s69, 2014.

DJUKIC-VUKOVIC, A.; MOJOVIC, L. V.; JOKIC, B. M.; NIKOLIC, S. B.; PEJIN, J. Lactic acid production on liquid distillery stillage by *Lactobacillus rhamnosus* immobilized onto zeolite. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 454-458, 2013.

DONKOR, O.N.; HENRIKSSON, A.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth in vitro angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. **Lait – Dairy Science and Technology**, v. 86, p. 21-38, 2007.

DRAGONE, G.; MUSSATO, S. I.; SILVA, J. B. A. Utilização de mostos concentrados na produção de cervejas pelo processo contínuo: novas tendências para o aumento da produtividade. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, n. 27, p. 37-40, 2007.

DRAGONE, G.; SILVA, J. B. A. **Cerveja**. Em: VENTURINI-FILHO, W.G. Bebidas. V1: Bebidas Alcoólicas Ciência e Tecnologia. São Paulo: Ed Blucher, 2010. 461p.

EBC. European Brewery Convention, Analytica-EBC, 4th ed. Sections 4.10 and 8.10, Brauerei – und Getranke – Rundschau: Zurich, Germany. European Brewery Convention, 1987.

EBC. European Brewery Convention, Analytica-EBC, 7th ed. Sections 3.3.1 and 4.3.1, Fachverlag Hans Carl: Nürnberg, Germany, 2008.

El SODA, M.; AHMED, N.; OMRAN, N.; OSMAN, G.; MORSI, A. Isolation, identification and selection of lactic acid bacteria cultures for cheese making. ***Emirates Journal* of *Agricultural Sciences**, v. 15, p. 51-71, 2003.*

EMBRAPA. Agência de Informação EMBRAPA, Agronegócios do Leite. Disponível em http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Agencia8.html (Acesso 14/05/2014).

FAULDS, C. B.; COLLINS, S.; ROBERTSON, J. A.; TREIMO, J.; EIJSINK, V. G. H.; HINZ, S. W. A.; SCGOLS, H. A.; BUCHERT, J.; WALDRON, K. W. Protease-induced solubilisation of carbohydrates from brewer's spent grain. **Journal of Cereal Science**, v. 50, p. 332-336, 2009.

FERNANDEZ-LAHORE, H. M.; FRAILE, E. R.; CASCONE, O. Acid protease recovery from a solid-state fermentation system. **Journal of Biotechnology**, v. 62, p. 83-93, 1998.

FERRAZ, A. J.; TEIXEIRA, J. A. The use of flocculating brewer's yeast for Cr (III) and Pb (II) removal from residual wastewaters. **Bioprocess Engineering**, n. 21, p. 431-437, 1999.

FERREIRA, M.P.L.V.O.; PINHO, O.; VIEIRA, E.; TAVARELA, J.G. Brewer's Saccharomyces yeast biomass: characteristics and potential applications. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, p. 77-84, 2010.

FILLAUDEAU, L.; BLANPAIN-AVET, P.; DAUFIN, G. Water, wastewater and waste management in brewing industries. **Journal of Cleaner Production**, v. 14, p. 463-471, 2006.

FIX, G. J. Diacetyl: Formation, Reduction and Control. **Brewing Techniques**, v.1, n.2. 1993.

FRANCO, G. **Tabela de composição química dos alimentos**. 8ª ed. p. 92, 135, 164, 196, 197. Atheneu Editora, Rio de Janeiro, 1989.

GAO, C.; MA, C.; XU, P. Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 930-939, 2011.

GARETZ, M. Hop storage. **Brewing Techniques**, v. 2, n. 1, 1994.

GENCHEVA, P.; DIMITROV, D.; DOBREV, G.; IVANOVA, V. Hydrolysates from malt spent grain with potential application in the bioethanol production. **Journal of BioScience and Biotechnology**, p. 135-141, 2012.

GEREZ, C. L.; DALLAGNOL, A.; ROLLAN, G.; de VALDEZ, G. F. A combination of two lactic acid bacteria improves the hydrolysis of gliadin during wheat dough fermentation. **Food Microbiology**, v. 32, p. 427-430, 2012.

GERMOND, J. E.; LAPIERRE, L.; DELLEY, M. MOLLET, B.; FELIS, G. E.; DELLAGLIO, F. Evolution of the bacterial species *Lactobacillus delbrueckii*: a partial genomic study with reflections on prokaryotic species concept. **Molecular Biology and Evolution**, v. 20, n. 1, p. 93-104, 2003.

GHAFFAR, T.; IRSHAD, M.; ANWAR, Z.; AQIL, T.; ZULIFQAR, Z.; TARIQ, A.; KAMRAN, M.; EHSAN, N.; MEHMOOD, S. Recent trends in lactic acid biotechnology: A brief review on

production to purification. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 7, p. 222-229, 2014.

GLOBAL DAIRY. **Market Outlook**. V. 17, n. 2, 2013.

GOBBETTI, M.; De ANGELIS, M.; CORSETTI, A.; CAGNO, R. Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, p. 57-69, 2005.

GOBBETTI, M.; LANCIOTTI, R.; De ANGELIS, M.; CORBO, M. R.; MASSINI, R.; FOX, P. Study of the effects of temperature, pH, NaCl, and a_w on the proteolytic and lipolytic activities of cheese-related lactic acid bacteria by quadratic response surface methodology. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 795-809, 1999.

GONZALEZ, L.; SACRISTAN, N.; ARENAS, R.; FRESNO, J. M.; TORNADIJO, M. E. Enzymatic activity of lactic acid bacteria (with antimicrobial properties) isolated from a traditional Spanish cheese. **Food Microbiology**, v. 27, p. 592-597, 2010.

GONZALEZ-GROSS, M.; LEBRON, M.R.; MARCOS, A. **Revisión bibliográfica sobre los efectos del consumo moderado de cerveza sobre la salud**. Instituto de Nutrición y Bromatologia, CSIC – UCM, 2000.

GOPI, K. K.; SANG, H. K. Effects of chemical compositions and ensiling on the biogas productivity and degradation rates of agricultural and food processing by-products. **Bioresource Technology,** v. 142, p. 553-561, 2013.

GORINSTEIN, S.; LEONTOWICZ, H.; LOJEK, A.; LEONTOWICZ, M.; CIZ, M.; GONZALEZ-STAGER, M. A.; MONTES, J.M.; TOLEDO, F.; ARANCIBIA-AVILA, P.; TRAKHTENBERG, S. Hypolipidemic effect of beer proteins in experiments on rats. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 35, p.265-271, 2002.

GORINSTEIN, S.; MOSHE, R.; BERLINER, M.; ROTENSTREICH, A.; TILIS, K. Characterization of stabilized and unstabilized beers. **Journal of Food Biochemistry**, v. 14, p. 161-172, 1990.

GORINSTEIN, S.; ZEMSER, M.; VARGAS-ALBORES, F.; OCHOA, J.L.; PAREDES-LOPEZ, O.; SCHELER, C.H.; SALNIKOW, J.; MARTIN-BELLOSO, O.; TRAKHTENBERG, S. Proteins and amino acids in beers, their contents and relationships with other analytical data. **Food Chemistry**, v.67, p. 71-78, 1999.

GREGORI, A.; SVAGELJ, M.; PAHOR, B.; BEROVIC, M.; POHLEVEN, F. The use of spent brewery grains for *Pleurotus ostreatus* cultivation and enzyme production. **New Biotechnology**, v. 25, n. 2/3, p. 157-161, 2008.

GUPTA, S.; JAISWAL, A. K.; ABU-GHANNAM, N. Optimization conditions for the utilization of brewing waste to develop a nutraceutical rich liquid product. **Industrial Crops and Products**, n. 44, p. 272-282, 2013.

HARRISON, J. S. Yeast production. In: HOCKENHULL, D. J. D. **Progress in industrial microbiology**. London, Colchester and Beccles, 1971. P. 129-178.

HASHEMI, M.; RAZAVI, S. H.; SHOJAOSADATI, S. A.; MOUSAVI, S. M. The potential of brewer's spent grain to improve the production of α-amylase by *Bacillus* sp. KR-8104 in submerged fermentation system. **New Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 165-172, 2011.

HAUNOLD, A.; NICKERSON, G. B. Factors affecting hop production, quality and brewer preference. **Brewing Techniques**, v.1, n.1, 1993.

HOFVENDAHL, K.; HAHN-HAGERDAL, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, p. 87-107, 2000.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; Staley, J. T.; Williams, S. T. **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology**, 9 ed. Williams & Wilkins, USA, 1994.

HORNSEY, I. S. **Brewing**. The Royal Society of Chemistry, 1999.

HOUGH, J. S. **Biotecnología de la Cerveza y de la Malta**. Editora Acribia, S.A. Zaragoza, Espana, 1990. 187p.

HUGHES, P. S. Preparative regime for the purification of bitter acids derived from hops (*Humulus lupulus* L.). **Journal of Chromatography A**. n. 731, p. 327-330, 1996.

HUNTER-CEVERA, J. C.; BELT, A. **Maintaining cultures for biotechnology and industry**. Academic Press, Inc., 1996. 263p.

IERSEL, M. F. M.; DIEREN, B.; ROMBOUTS, F. M.; ABEE, T. Flavor formation and cell physiology during the production of alcohol-free beer with immobilized *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p. 407-411, 1999.

IKRAM-UL-HAQ; MUKHTAR, H. Biosynthesis of protease from *Lactobacillus paracasei*: Kinetic analysis of fermentation parameters. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 43, p. 377-381, 2006.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos, 4 ed., São Paulo, 2008. p. 122.

JAIN, N.; BHARGAVA, A.; SABAT, D.; PANWAR, J. Unveiling the potential of metal-tolerant fungi for efficient enzyme production. **Process Biochemistry,** v. 49, p. 1858-1866, 2014.

JAWAD, A. H.; ALKARKHI, A. F. M.; JASON, O. C.; EASA, A. M.; NORULAINI, N. A. Production of the lactic acid from mango peel waste – factorial experimente. **Journal of King Saud University – Science**, v. 25, p. 39-45, 2013.

JOHNSTON, D. B.; McALOON, A. J. Protease increase fermentation rate and ethanol yield in dry-grind ethanol production. **Bioresource Technology**, v. 154, p. 18-25, 2014.

JONES, A. M.; INGLEDEW, W. M. Fermentation of very high gravity wheat mash prepared using fresh yeast autolysate. **Bioresource Technology**, n. 50, p. 97-101, 1994.

JORNAL DA CERVEJA. Disponível em http://www.jornaldacerveja.com/#!mesa-quase-redonda-2/c1rmk. Acesso 18/08/2013.

KABADJOVA-HRISTOVA, P.; BAKALOVA, S.; GOCHEVA, B.; MONCHEVA, P. Evidence for proteolytic activity of lactobacilli isolated from kefir grains. **Biotechnol e Biotechnol Eq**, v. 20, n. 2, p. 89-94, 2006.

KANDLER, O.; WEISS, N. Regular, nonsporing Gram-positive rods. In: BERGEY, D. H. Bergey's manual of systematic bacteriology, v. 2, 1986, p. 1208-1223.

KAPP, G. R.; BAMFORTH, C. W. The foaming properties of proteins isolated from barley. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 82, p. 1276-1281, 2002.

KARP, S. G.; IGASHIYAMA, A. H.; SIQUEIRA, P. F.; CARVALHO, J. C.; VANDENBERGHE, L. P. S.; THOMAZ-SOCCOL, V.; CORAL, J.; THOLOZAN, J. L.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Application of the biorefinery concept to produce L-lactic acid from the soybean vinasse at laboratory and pilot scale. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 1765-1772, 2011.

KAUR, V. I.; SAXENA, P. K. Incorporation of brewery waste in supplementary feed and its impact on growth in some carps. **Bioresource Technology**, v. 91, p. 101-104, 2004.

KHAN, A. W.; RAHMAN, M. S.; ANO, T. Application of malt residue in submerged fermentation of *Bacillus subtilis*. **Journal of Environmental Sciences**, v. 21, S33-S35, 2009.

KIRILOV, N.; PETKOVA, T.; ATRANSOVA, J.; DANOVA, S.; ILIEV, I.; POPOV, Y.; HAERTLE, T.; IVANOVA, V. Proteolytic activity in lactic acid bacteria from Iraq, Armenia and Bulgaria. **Biotechnol & Biotechnol EQ**. v. 23, sup1, p. 643-646, 2009.

KIVANÇ, M.; YILMAZ, M.; ÇAKIR, E. Isolation and identification of lactic acid bacteria from boza, and their microbial activity against several reporter strains. **Turkish Journal of Biology**, v. 35, p. 313-324, 2011.

KLAGENBOECH, R.; THOMAZINI, M.H.; SILVA, G.M.C. Resíduo úmido de cervejaria: uma alternative na alimentação animal. **Anais do III ENDICT** – Encontro da Divulgação Científica e Tecnológica, 2011.

KLOSOWSKI, G.; MIKULSKI, D.; CZUPRYNSKI, B.; KOTARSKA, K. Characterization of fermentation of high-gravity maize mashes with the application of pullulanase, proteolytic enzymes and enzymes degrading non-starch polysaccharides. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 109, n. 5, p. 466-471, 2010.

KNUDSEN, F. B. **Fermentation principles and practice** (in: BRODERICK, H. M. The practical brewer). Master Brewer Association of the Americas, 2nd ed, 1978.

KOK, J.; VENEMA, G. Genetics of proteinases of lactic acid bacteria. **Biochimie**, v. 70, p. 475-488, 1988.

KONDO, K. Beer and health: preventive effects of beer components on lifestyle-related diseases. **BioFactors**, v. 22, p. 303-310, 2004.

KOPSAHELIS, N.; AGOURIDIS, N.; BEKATOROU, A.; KANELLAKI, M. Comparative study of spent grains and deligniwed spent grains as yeast supports for alcohol production from molasses. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1440-1447, 2007.

KORDIALIK-BOGACKA, E.; AMBROZIAK, W. Investigation of foam-active polypeptides during beer fermentation. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, p. 1960-1968, 2004.

KUHBECK, F.; MULLER, M.; BACK, W.; KURZ, T.; KROTTENTHALER, M. Effect of hot trub and particle addition on fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 711-720, 2007.

KUMAR, M. N.; GIALLELI, A. I.; MASSON, J. B.; KANDYLIS, P.; BEKATOROU, A.; KOUTINAS, A. A.; KANELLAKI, M. Lactic acid fermentation by cells immobilized on various porous cellulosic materials and their alginate/poly-lactic acid composites. **Bioresource Technology**, v. 165, p. 332-335, 2014.

KUMAR, R. S.; ANANTHAN, G.; PRABHU, A. S. Optimization of medium composition for alkaline protease production by *Marinobacter* sp. GA CAS9 using response surface methodology – A statistical approach. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 3, p. 191-197, 2014.

KUNZE, W. **Technology Brewing and Malting**. 2 ed. Germany: VLB, 1999. 726p.

KURAKAKE, M.; UEKI, M.; HASHIMOTO, S.; KOMAKI, T. Adsorption of α-amylase on dextrin immobilized on kieselguhr or chitin. **Carbohydrate Polymers**, v. 34, p. 55-59, 1997.

LAW, J.; HAANDRIKMAN, A. Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 1-11, 1997.

LEI, H.; ZHAO, H.; ZHAO, M. Proteases supplementation to high gravity worts enhances fermentation performance of brewer's yeast. **Biochemical Engineering Journal**, v. 77, p. 1-6, 2013.

LEI, H.; ZHENG, L.; WANG, C.; ZHAO, H.; ZHAO, M. Effects of worts treated with proteases on the assimilation of free amino acids and fermentation performance of lager yeast. **International Journal of Food Microbiology**, v. 161, p. 76-83, 2013.

LEWIS, M. J.; YOUNG, T. W. **Brewing**. 2 ed. Aspen Publishers Inc, 2001.

LI, Z.; LU, J.; YANG, Z.; HAN, L. TAN, T. Utilization of white rice bran for production of L-lactic acid. **Biomass and Bioenergy**, v. 39, p. 53-58, 2012.

LIANG, S.; McDONALD, A. G.; COATS, E. R. Lactic acid production with undefined mixed culture fermentation of potato peel waste. **Waste Manegement**, v. 34, p. 2022-2027, 2014.

LIMA, U. A. **Matérias-primas dos Alimentos**. São Paulo: Ed Blucher, 2010. 402p.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. V.3, Processos Fermentativos e Enzimáticos. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2001a.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial**. V.4, Biotecnologia na Produção de Alimentos. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2001b.

LIN, S.; ZHANG, M.; LIU, J.; JONES, G. S. Construction and application of recombinant strain for the production of an alkaline protease from *Bacillus licheniformis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. xx, p. 1-5, 2014.

LIN, S.; ZHANG, M.; LIU, J.; JONES, G. S. construction and application of recombinant strain for the production of na alcaline protease from *Bacillus licheniformis*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. xx, p. 1-5, 2014.

LINKO, M.; HAIKARA, A.; RITALA, A.; PENTTILA, M. Recent advances in the malting and brewing industry. **Journal of Biotechnology**. n. 65, p. 85-98, 1998.

LOCQUIN, M.; LANGERON, M. **Handbook of Microscopy**. Butterworth & Co, França, 1983.

LOWE, D. P.; ARENDT, E. K. The use and effects of lactic acid bacteria in malting and brewing with their relationships to antifungal activity, mycotoxins and gushing: A review. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 110, n. 3, p. 163-180, 2004.

LOWE, D. P.; ARENDT, E. K.; SORTANO, A. M.; ULMER, H. M. The influence of lactic acid bacteria on the quality of malt. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 11, n. 1, p. 42-50, 2005.

MA, K.; TOSHINARI, M.; YOU, H.; SHIRAI, Y. Open fermentative of L-lactic acid with high optical purity by thermophilic *Bacillus coagulans* using excesso sludge as nutrient. **Bioresource Technology**, v. 151, p. 28-35, 2014.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. BROCK. **Biologia de los Microorganismos**. 10 ed. Perarson Prentice Hall, 2004. 1096p.

MAGHSOODI, V.; KAZEMI, A.; NAHID, P.; YAGHMAEI, S.; SABZEVARI, M. A. Alkaline protease production by immobilized cells using *B. licheniformis*. **Scientia Iranica**, v. 20, n. 3, p. 607-610, 2013.

MAGHSOODI, V.; KAZEMI, A.; NAHID, P.; YAGHMAEI, S.; SABZEVARI, M. A. Alkaline protease production by immobilized cells using *B. licheniformis*. **Scientia Iranica**, v. 20, n. 3, p. 607-610, 2013.

MAN-JIN, I.; DONG, C. K.; CHAE, H. J. Downstream process for the production of yeast extract using brewer's yeast cells. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, n. 10, p. 85-90, 2005.

MANNING, M.P. Understanding specific gravity and extract. **Brewing Techniques**, v. 1, n. 3, 1993.

MARKOVIC, I.; DEPONTE, R.; MARIC, V.; JOHANIDES, V. Enzymic hydrolysis of protein during barley spent grains mashing. **Process Biochemistry**, v. 30, n. 5, p. 411-419, 1995.

MARKOVIC, R. S.; GRUJIC, O. S.; PEJIN, J. D. Conventional and alternative principles for stabilization of protein and polyphenol fractions in beer. **APTEFF**, n. 34, p. 3-12, 2003.

MARQUES, P. A.; PINHEIRO, H. M.; ROSA, M. F. Cd (II) removal from aqueous solution by immobilized waste brewery yeast in fixed-bed and airlift reactors. **Desalination**, n. 214, p. 343-351, 2007.

MARQUES, P. A.; PINHEIRO, H. M.; TEIXEIRA, J. A.; ROSA, M. F. Removal of Cu^{2+}, Cd^{2+} and Pb^{2+} by waste brewery biomass: pH and cation association effects. **Desalination**, n. 124, p. 137-144, 1999.

MARTINEZ, F. A. C.; BALCIUNAS, E. M.; SALGADO, J. M.; GONZALEZ, J. M. D.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, R. P. S. Lactic acid properties, applications and production: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 30, p. 70-83, 2013.

MARTINS, Z. E. S. V. Avaliação da actividade proteolítica de bactérias lácticas isoladas de queijo Serra da Estrela. Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação, Universidade do Porto, Portugal, 2006.

MATAIX, J. La cerveza, tradición y cultura mediterránea. **Cerveza e Salud**, v. 161, p. 41-44, 2004.

MEDEIROS, C. D. Efeito de variáveis de processo no tempo de fermentação da cerveja e na concentração das diacetonas vicinais (TVDK). **Dissertação de Mestrado** (em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN. 2010.

MEENA, P.; TRIPATHI, A. D.; SRIVASTAVA, S. K.; JHA, A. Utilization of agro-industrial waste (wheat bran) for alcaline protease production by *Pseudomonas aeruginosa* in SSF using Taguchi (DOE) methodology. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 210-216, 2013.

MELLO, P. P. M. Tratamento do mosto pronto, Curso Técnico de Cervejaria, SENAI, Vassouras, RJ, 2008.

MENG, Y.; XUE, Y.; YU, B.; GAO, C.; MA, Y. Efficient production of L-lactic acid with high optical purity by alkaliphilic *Bacillus* sp. WL-S20. **Bioresource Technology**, v. 116, p. 334-339, 2012.

MEUSSDOERFFER, F. G. A Comprehensive History of Beer Brewing. In: EBLINGER, H. M. **Handbook of Brewing: Process, Technology, Markets**. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, 2009.

MIMITSUKA, T.; SAWAI, K.; TSUKADA, T.; TAKEUCHI, N.; YAMADA, K.; OGINO, H.; TETSU, Y. Production of D-lactic acid in a continuous membrane integrated fermentation reactor by genetically modified *saccharomyces cerevisiae*: enhancement in D-lactic acid carbono yield. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. xx, p. 1-7, 2014.

MORRIS, P. C.; BRYCE, J. H. **Cereal Biotechnology**. CRC Press and Woodhead Publishing Limited, England, 2000. 242p.

MOSLEHISHAD, M.; MIRDAMADI, S.; EHSANI, M. R.; EZZATPANAH, H.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. The proteolytic activity of selected lactic acid bacteria in fermenting cow's and camel's Milk and the resultant sensory characteristics of the products. **International Journal of Dairy Technology**, v. 66, n. 2, p. 279-285, 2013.

MOULAY, M.; AGGAD, H.; BENMECHERNENE, Z.; GUESSAS, B.; HENNI, D. E.; KIHAL, M. Cultivable lactic acid bacteria isolated from Algerian raw goat's milk and their proteolytic activity. **World Journal of Dairy & Food Sciences**, v. 1, p. 12-18, 2006.

MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V., W. **Harper's Biochemistry**. 23 ed: Prentice Hall, USA, 1993. 806p.

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

MUSSATO, S. I.; FERNANDES, M.; MANCILHA, I. M.; ROBERTO, I. C. Effects of medium supplementation and pH control on lactic acid production from brewer's spent grain. **Biochemical Engineering Journal**, v. 40, p. 437-444, 2008.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5 ed: ARTMED, 2011. 1304p.

NGUYEN, C. M.; KIM, J. S.; NGUYEN, T. N.; KIM, S. K.; CHOI, G. J.; CHOI, Y. H.; JANG, K. S.; KIM, J. C. Production of L-lactic acid from waste *Curcuma longa* biomass through simultaneous saccharification and cofermentation. **Bioresource Technology**, v. 146, p. 35-43, 2013.

NGUYVEN, M.; van ROON, J.; EDENS, L. Boost savings by removing cold stabilization. **Brauwelt International**, 2007.

NIEMI, P.; FAULDS, C. B.; SIBAKOV, J.; HOLOPAINEN, U.; POUTANEN, K.; BUCHERT, J. Effect of a milling pre-treatment on the enzymatic hydrolysis of carbohydrates in brewer's spent grain. **Bioresource Technology**, n. 116, p. 155-160, 2012.

NIEMI, P.; MARTINS, D.; BUCHERT, J.; FAULDS, C. B. Pre-hydrolysis with carbohydratases facilitates the release of protein from brewer's spent grain. **Bioresource Technology**, v. 136, p. 529-534, 2013.

O'ROURKE, T. The function of enzymes in brewing. **The Brewer International, Techinical Summary**, v. 9, n. 2, p. 14-18, 2002.

OKPARA, A. N.; OKOLO, B. N.; UGWUANYI, J. O. Antimicrobial activities of lactic acid bacteria isolated from akamu and kunun-zaki (cereal based non-alcoholic beverages) in Nigeria. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 29, p. 2977-2984, 2014.

OLAJIRE, A. A. The brewing industry and environmental challenges. **Journal of Cleaner Production**, p. 1-21, 2012.

OLIVEIRA, L. F. Avanços do uso da bromelina na área de alimentação e saúde. **Alimentos** e Nutrição Araraquara, v. 12, p. 215-226, 2001.

OLIVEIRA, M. A. B. **Cerveja: análise sensorial e fabricação**. Cachoeiro de Itapemirim, 2009.

OMIDIJI, O.; OKPUZOR, J.E. Enzymic recovery of extract from cold trub derived from brewing with un-malted sorghum (*Sorghum bicolor*). **Process Biochemistry**, v. 37, p. 787-792, 2002.

ONISHI, A.; PROUDLOVE, M. O. Isolation of beer foam polypeptides by interaction chromatography and their partial characterization. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 65, p. 233-240, 1994.

OUYANG, J.; MA, R.; ZHENG, Z.; CAI, C.; ZHANG, M.; JIANG, T. Open fermentative production of L-lactic acid by *Bacillus* sp. Strain NL01 using lignocellulosic hydrolyzates as low-cost raw material. **Bioresource Technology**, v. 135, p. 475-480, 2013.

OWENS, G. **Cereals Processing Technology**. CRC Press and Woodhead Publishing Limited, England, 2001. 230p.

PANDEY, A.; SOCCOL, C. R.; NIGAM, P.; SOCCOL, V. T. Biotechnological potential of agro-industrial residues I: sugarcane bagasse. **Bioresource Technology**, v. 74, n. 1, p. 69-80, 2000.

PANESAR, P. S.; KENNEDY, J. F.; GANDHI, D. N.; BUNKO, K. Bioutilization of whey for lactic acid production. **Food Chemistry**, v. 105, p. 1-14, 2007.

PANT, G.; PRAKASH, A.; PAVANI, J. V. P.; BERA, S.; DEVIRAM, G. V. N. S.; KUMAR, A.; PANCHPURI, M.; PRASUNA, R. G. Production, optimization and partial purification of protease from *Bacillus subtilis*. **Journal of Taibah University for Science**, p. 1-6, 2014.

PELCZAR, M. J.; REID, R. D.; CHAN, E. C. S. **Microbiology**. McGraw-Hill: New York, 1977. 952p.

PEREZ-CARRILO, E.; SERNA-SALDIVAR, S. O.; CHUCK-HERNANDEZ, C.; CORTE-CALLEJAS, M. L. Addition of protease during starch liquefaction affects free amino nitrogen, fusel alcohols and ethanol production of fermented maize and whole and decorticated sorghum mashes. **Biochemical Engineering Journal**, v. 67, p. 1-9, 2012.

PESCUMA, M.; HERBERT, E. M.; MOZZI, F.; VALDEZ, G. F. Whey fermentation by thermophilic lactic acid bacteria: Evolution of carbohydrates and protein content. **Food Microbiology**, v. 25, p. 442-451, 2008.

PINTO, L. C. Aproveitamento de produtos derivados de levedura (*Saccharomyces* sp.) para o enriquecimento nutricional de alimentos à base de mandioca (*Manihot esculenta* CRANTZ). **Dissertação de Mestrado** em Ciência de Alimentos, Universidade Federal da Bahia, 2011.

PINTO, L. C.; LOPES, M. V.; CARVALHO FILHO, C. D.; ALVES, L. V. A.; BENEVIDES, C. M. J. Determinação do valor nutritivo de derivados de levedura de cervejaria (*Saccharomyces* spp.). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 15, n. 1, p. 7-17, 2013.

PIRAINO, P.; ZOTTA, T.; RICCIARDI, A.; McSWEENEY, P. L. H.; PARENTE, E. Acid production, proteolysis, autolytic and inhibitory properties of lactic acid bacteria isolated from pasta filata cheeses: a multivariate screening study. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 81-92, 2008.

PLESSAS, S.; TRANTALLIDI, M.; BEKATOROU, A.; KANELLAKI, M.; NIGAM, P.; KOUTINAS, A. A. Immobilization of kefir and *Lactobacillus casei* on brewery spent grains for use in sourdough wheat bread making. **Food Chemistry**, n. 105, p. 187-194, 2007.

PRESCOTT, S. C.; DUNN, C. G. **Industrial Microbiology.** 2.ed. New York: McGraw-Hill, 1949, 923p.

PRIEST, F. G.; STEWART, G. G. **Handbook of Brewing**. 2 ed. Florida: CRC Press and Taylor & Francis Group, 2006. 829p.

RAJ, A.; KHESS, N.; PUJARI, N.; BHATTACHARYA, S.; DAS, A.; RAJAN, S. S. Enhancement of protease production by *Pseudomonas aeruginosa* isolated from dairy effluent sludge and determination of its fibrinolytic potential. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. s1845-s1851, 2012.

RAMALHO, R. **Introduction to Wastewater Treatment Process**. 2 ed. Academic Press, 1983. 409p.

RATHOD, M. G.; PATHAK, A. P. Wealth from waste: Optimized alcaline protease production from agro-industrial residues by *Bacillus alcalophilus* LW8 and its biotechnological applications. **Journal of Taibah University for Science**, v. 8, p. 307-314, 2014.

REGULY, J.C. **Biotecnologia dos Processos Fermentativos**. V1: Fundamentos, matérias-primas agrícolas, produtos e processos. Editora Universitária, UFPel, 1996.

REHM, H.J.; REED, G. **Biotechnology**. V.3, 1st Edition, Germany: Verlag Chemie, 1983, 642p.

REHMANJI, M.; GOPAL, C.; MOLA, A. Beer stabilization technology – Clearly a matter of choice. **MBAATQ**, v. 42, n. 4, p. 332-338, 2005.

REINOLD, M. R. A filtração da cerveja. **Revista Indústria de Bebidas**, Ano 6, n. 35, 2007.

REINOLD, M. R. A pasteurização da cerveja. **Revista Indústria de Bebidas**, Ano 8, edição especial, 2009.

REINOLD, M. R. Fatores importantes para a elaboração de uma cerveja de qualidade. **Revista Indústria de Bebidas**, Ano 7, n. 41, 2008.

REINOLD, M. R. **Manual Prático de Cervejaria**. Editora Aden, São Paulo, 1997.

REVISTA EXAME. Os países que mais bebem e produzem cerveja. 2012. Disponível em http://exame.abril.com.br/economia/noticias/os-paises-que-mais-bebem-e-produzem-cerveja#1 (acesso 09/08/2013).

RIBEIRO, E.P.; SERAVALLI, E.A.G. **Química de Alimentos**. Ed. Blucher, 2ª ed. São Paulo, 2003.

RIORDAN, C.; BUSTARD, M.; PUTT, R.; McHALE, A. P. Removal of uranium from solution using residual brewery yeast: combined biosorption and precipitation. **Biotechnology Letters**, v. 19, n. 4, p. 385-387, 1997.

ROBERTSON, J. A.; I'ANSON, K. J. A.; TREIMO, J.; FAULDS, C. B.; BROCKLEHURST, T. F.; EIJSINK, V. G. H.; WALDRON, K. W. Profiling brewers' spent grain for composition and microbial ecology at the site of production. **Food Science and Technology**, n. 43, p. 890-896, 2010.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos**. 1ª ed. Editora: Casa do Pão, Campinas, São Paulo, 2005.

ROZADA-SANCHEZ, R.; SATTUR, A. P.; THOMAS, K.; PANDIELLA, S. S. Evaluation of *Bifidobacterium* spp. for the production of a potentially probiotic malt-based beverage. **Process Biochemistry**, v. 43, p. 848-854, 2008.

RUSS, W.; MORTEL, H.; MEYER-PITTROFF, R.; BABECK, A. Kieselguhr sludge from the deep bed filtration of beverages as a source for silicone in the production of calcium silicate bricks. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 26, p. 2547-2599, 2006.

SALMINEM, S.; WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**, 3rd edition. Macel Dekker, Inc.: New York, 2004. 656p.

SÁNCHEZ, C.L.; FRANCO, L.; BRAVO, R.; RUBIO, C.; RODRIGUEZ, A.B.; BARRIGA, C.; CUBERO, J. Cerveza y salud, benefícios em el sueño. **Revista Española de Nutrición Comunitaria**, v. 16, n. 3, p. 160-163, 2010.

SANTOS, A. C. A. Acompanhamento do oxigênio dissolvido na cerveja durante o processo de fermentação e maturação. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Graduação em Engenharia de Alimentos), Universidade Católica de Goiás UCG, 2003.

SANTOS, M.; JIMENEZ, J. J.; BARTOLOME, B.; GOMEZ-CORDOVES, C.; NOZAL, M. J. Variability of brewer's spent grain within a brewery. **Food Chemistry**, n. 80, p. 17-21, 2003.

SANTUCCI, M. C. C.; ALVIM, I. D.; SCHMIT, F.; FARIA, E.; SGARBIERI, V. C. Enriquecimento de macarrão tipo tubo (massa curta) com derivados de levedura (*Saccharomyces* sp.): impacto nutricional e sensorial. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 23, n. 2, p. 290-295, Campinas, 2003.

SAURA, F.D. et al. Fibra dietética en cerveza: contenido, composición y evaluación nutricional (2° parte y final). **Cerveza e Salud**, v. 159, p. 61-67, 2003.

SAVIJOKI, K.; INGMER, H.; VARMANEN, P. Proteolytic systems of lactic acid bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, p. 394-406, 2006.

SCHEPERS, A. W.; THIBAULT, J.; LACROIX, C. Continuous lactic acid production in whey permeate/yeast extract médium with immobilized *Lactobacillus helveticus* in a two-stage

process: model and experiments. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, p. 324-337, 2006.

SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Biotecnologia Industrial**. V.2, Engenharia Bioquímica. São Paulo: Editora Edgard Blucher, 2001.

SCHONBERGER, C.; KOSTELECKY, T. The role of hops in brewing. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 117, p. 259-267, 2011.

SENTHURAN, A.; SENTHURAN, V.; HATTI-KAUL, R.; MATTIASSON, B. Lactic acid production by immobilized *Lactobacillus casei* in recycle batch reactor: a step towards optimization. **Journal of Biotechnology**, v. 73, p. 61-70, 1999.

SGARBIERI, V. C.; ALVIM, I. D.; VILELA, E. S. D.; BALDINI, V. L.S.; BRAGAGNOLO. Produção piloto de derivados de levedura (*Saccharomyces* sp.) para uso como ingredients na formulação de alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 2, p. 119-125, 1999.

SHAH, F.; KHAN, K. I.; J, K. T. Isolation and freeze drying of certain probiotic strains. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 4, n. 11, p. 40-45, 2013.

SHARMA, A.; SHARMA, S.; YADAV, S.; NAIK, S. N. Role of Karanja deoiled cake based medium in production of protease and fatty acids by *Paecilomyces lilacinus* 6029. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 118, n. 3, p. 270-271, 2014.

SHI, z.; WEI, P.; ZHU, X.; CAI, J.; HUANG, L.; XU, Z. Efficient production of L-lactic acid from hydrolysate of *Jerusalem artichoke* with immobilized cells of *Lactococcus lactis* in fibrous bed bioreactors. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 51, p. 263-268, 2012.

SHINATA, A.; SHAH, N. P. Proteolytic profiles of yogurt and probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 10, p. 401-408, 2000.

SHINDO, S.; MURAKAMI, J.; KOSHINO, S. Control of acetate ester formation during alcohol fermentation with immobilized yeast. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 73, n. 5, p. 370-374, 1992.

SHOTIPRUK, A.; KITTIANONG, P.; SUPHANTHARIKA, M.; MUANGNAPOH, C. Application of Rotary microfiltration in debittering process of spent brewer's yeast. **Bioresource Technology**, n. 96, p. 1851-1899, 2005.

SHUANG LI; YANG, X.; YANG, S.; ZHU, M.; WANG, X. Technology prospecting on enzymes: application, marketing and engineering. **Computacional, Andstructural, Biotechnology Journal**, v. 2, p.1-11, 2012.

SIEBERT, K. J. Haze formation in beverages. **LWT**, n. 39, p. 987-994, 2006.

SINDICERV. Sindicato Nacional da Indústria da Cerveja. Disponível em www.sindcerv.com.br

STANBURY, P. F.; WHITAKER, A.; HALL, S. J. **Principles of fermentation technology**, 2 ed. Amsterdan: 1995.

STEINMACHER, N. C.; HONNA, F. A.; GASPARETTO, A. V.; ANIBAL, D.; GROSSMANN, M. V. E. Bioconversion of brewer's spent grains by reactive extrusion and their application in bread-making. **Food Science and Technology**, n. 46, p. 542-547, 2012.

STREDANSKY, M.; CONTI, E. Xanthan production by solid state fermentation. **Process Biochemistry**, v. 34, p. 581-587, 1999.

SUGANTHI, C.; MAGESWARI, A.; KARTHIKEYAN, S.; ANBALAGAN, M.; SIVAKUMAR, A.; GOTHANDAM, K. M. Screening and optimization of protease production from halotolerant *Bacillus licheniformis* isolated from saltern sediments. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology,** v. 11, p. 47-52, 2013.

TAKAFUJI, S.; IWASAKI, T.; SASAKI, M.; TAN, P. S. T. Proteolytic enzymes of lactic acid bacteria. In: CHARALAMBOUS, G. **Food Flavors: Generation, Analysis and Process Influence**. Ed Elsevier Science, 1995. 2236p.

TAMIME, A. Y. **Fermented Milks**. Blackwell Science Ltd, 2006.

TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R. K. **Yoghurt Science and Technology**. Woodhead Publishing LTDA, 2000.

TANGULER, H.; ERTEN, H. Utilisation of spent brewer's yeast for yeast extract production by autolysis: the effect of temperature. **Food and Bioproducts Processing**, n. 86, p. 317-321, 2008.

TAVANO, O. L. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, V. 90, p. 1-11, 2013.

TERZIC-VIDOJEVIC, A.; MIHAJLOVIC, S.; UZELAC, G.; VELJOVIC, K.; TOLINACKI, M.; NIKOLIC, L.; TOPISIROVIC, L.; KOJIC, M. Characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Travnik young cheeses, sweet creams an sweet kajmaks over four seasons. **Food Microbiology**, v. 39, p. 27-38, 2014.

TESTER, R.F.; KARKALAS, X.Q.J. Hydrolysis of native starches with amylases. **Animal Feed Science and Technology**. V. 130, p. 39-54, 2006.

TEUSINK, B.; BACHMANN, H.; MOLENAAR, D. Systems biology of lactic acid bacteria: a critical review. **Microbial Cell Factories**, v. 10, p.1-17, 2011.

THANAPIMMETHA, A.; LUADSONGKRAM, A. TITAPIWATANAKUN, B.; SRINOPHAKUN, P. Value added waste of *Jatropha curcas* residue: optimization of protease production in solid state fermentation by Taguchi DOE methodology. **Industrial Crops and Products**, v. 37, p. 1-5, 2012.

THYS, R. C. S.; GUZZON, S. O.; CLADERA-OLIVERA, F.; BRANDELLI, A. Optimization of protease production by *Microbacterium* sp. In feather meal using response surface methodology. Process Biochemistry, v. 41, p. 67-73, 2006.

THYS, R. C. S.; GUZZON, S. O.; CLADERA-OLIVERA, F.; BRANDELLI, A. Optimization of protease production by *Microbacterium* sp. In feather meal using response surfasse methodology. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 67-73, 2006.

TINSETH, G. The essential oil of hops: aroma and flavour in hops and beer. **Brewing Techniques**, v. 2, n. 1, 1994.

TODAR, K. **Lactic Acid Bacteria**. In: Todar's Online Textbook of Bacteriology. Disponível em http://textbookofbacteriology.net/lactics_1.html. (Acesso 30/03/2015).

TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia**. 10 ed. ARTMED, 2011. 894p.

TOSUNGNOEN, S.; CHOOKIETWATTANA,K.; DARARAT, S. Lactic acid production from repeated-batch and simultaneous saccharification and fermentation of cassava starch wastewater by amylolytic *Lactobacillus plantarum* MSUL 702. **APCBEE Procedia**, v. 8, p. 204-209, 2014.

TREIMO, J.; ASPMO, S. I.; EUSINK, V. G. H. HORN, S. J. Enzymatic solubilization of proteins in brewer's spent grains. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, n. 56, p. 5359-5365, 2008.

TSCHOPE, E. C. **Microcervejarias e Cervejarias: A história, a arte e a tecnologia**. Editora Aden, São Paulo, 2001.

TULI, A.; SETHI, R. P.; KHANNA, P. K.; MARWAHA, S. S. Lactic acid production from whey permeate by immobilized *Lactobacillus casei*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 7, p. 164-168, 1985.

TZU-WEN, L.; JIA-LIN, H.; SAN-LANG, W. Production of a protease, a chitosanase, and chitin oligosaccharides by *Bacillus cereus* TKU022 fermentation. **Carbohydrate Research**,v. 362, p. 38-46, 2012.

VANDERHAEGEN, B.; DELVAUX, F.; DAENEN, L.; VERACHTERT, H.; DELVAUX, F. R. Aging characteristics of different beer types. **Food Chemistry**, n. 103, p. 404-412. 2006.

VANDERHAEGEN, B.; NEVEN, H.; VERACHTERT, H.; DERDELINCKX, G. The chemistry of beer aging – a critical review. **Food Chemistry**, n. 95, p. 357-381, 2006.

VIEIRA, E.; BRANDAO, T.; FERREIRA, I.M.P.L.V.O. Evaluation of brewer's spent yeast to produce flavor enhancer nucleotides: influence of serial repitching. **J. Agric. Food Chem**, v. 61, n. 37, p. 8724-8729, 2013a.

VIEIRA, E.; MOURA, C.; ALMEIDA, T.; MEIRELES, S.; BRANDAO, T.; PINHO, O.; FERREIRA, I.M. Influence of serial repitching on beer polypeptide profiles. **J. Am. Soc. Brew. Chem**. V. 4, p. 275-279, 2013b.

VIEIRA, E.; ROCHA, M.A.M.; COELHO, E.; PINHO, O.; SARAIVA, J.A.; FERREIRA, I.M.P.L.V.O, COIMBRA, M.A. Valuation of brewer's spent grain using a fully recyclable integrated process

for extraction of proteins and arabinoxylans. **Industrial Crops and Products** 52: 136-143, 2014.

VIEIRA, M. S.; SANTOS, V. M.; VIEIRA, A. A. Composição química e digestibilidade dos nutrientes do bagaço de cevada determinados em suínos em terminação. **Anais do XIII Encontro Latino-Americano de Iniciação Científica e IX Encontro Latino-Americano de Pós Graduação**, Paraíba, 2006.

VIJAYARAGHAVAN, P.; LAZARES, S.; VICENT, S. G. P. De-hairing protease production by an isolated *Bacillus cereus* strain AT under solid-state fermentation using cow dung: biosynthesis and properties. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 21, p. 27-34, 2014.

VILELA, E. S. D.; SGARBIERI, V. C.; ALVIM, I. D. Determinação do valor proteico de células íntegras, autolisado total e extrato de levedura (*Saccharomyces* sp.). **Revista de Nutrição**, v. 13, n. 3, p. 185-192, Campinas, 2000a.

VILELA, E. S. D.; SGARBIERI, V. C.; ALVIM, I. D. Valor nutritivo da biomassa de células íntegras, do autolisado e do extrato de levedura originária de cervejaria. **Revista de Nutrição**, v. 13, n. 2, p. 127-134, Campinas, 2000b.

WAGLAY, A.; KARBOUNE, S.; ALLI, I. Potato protein isolates: Recovery and characterization of their properties. **Food Chemistry**, v. 142, p. 373-382, 2014.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and Technology**. 2nd edition, CRC Press, USA, 2006.

WANG, D.; SAKODA, A.; SUZUKI, M. Biological efficiency and nutritional value of *Pleurotus ostreatus* cultivated on spent beer grain. **Bioresource Technology**, n. 78, p. 293-300, 2001.

WANG, Y.; TASHIRO, Y.; SONOMOTO, K. Fermentative production of lactic acid from renewable materials: Recent achievements, prospects and limits. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 119, p. 1-9, 2014.

WEE, Y. J.; RYU, H. W. Lactic acid production by *Lactobacillus* sp. RKY2 in a cell-recycle continuous fermentation using lignocellulosic hydrolyzates as inexpensive raw materials. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 4262-4270, 2009.

WILLIAMS, A. G.; NOBLE, J.; BANKS, J. M. Catabolism of amino acids by lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 203-215, 2001.

WISTREICH, G. A.; LECHTMAN, M. D. **Laboratory exercises in microbiology**. Macmillan Publishing Co., Inc. New York, 1980.

WOOD, B. J. B.; HOLZAPFEL, W. H. **The genera of lactic acid bacteria**, volume 2. Chapman & Hall, London, 1995. 398p.

WRIGHT, C.A.; BRUHN, C.M.; HEYMANN, H.; BAMFORTH, C.W. Beer and wine consumers' perceptions of the nutricional value of alcoholic and nonalcoholic beverages. **Journal of Food Science**, v. 73,n. 1, p. 8-11, 2008.

YAMADA, E. A.; ALVIM, I. D.; SANTUCCI, M. C. C.; SGARBIER, V. C. Composição centesimal e valor proteico de levedura residual de fermentação etanólica e de seus derivados. **Revista de Nutrição**, v. 16, n. 4, p. 423-432, 2003.

YAMAUCHI, Y.; OKAMOTO, T.; MURAYAMA, H.; KAJINO, K.; AMIKURA, T.; HIRATSU, H.; NAGARA, A.; KAMIYA, T.; INOUE, T. Rapid maturation of beer using an immobilized yeast bioreactor: 1. Heat conversion of α-acetolactate. **Journal of Biotechnology**. N. 38, p. 101-108, 1995a.

YAMAUCHI, Y.; OKAMOTO, T.; MURAYAMA, H.; KAJINO, K.; NAGARA, A.; NOGUCHI, K. Rapid maturation of beer using an immobilized yeast bioreactor: 2. Balance of total diacetyl reduction and regeneration. **Journal of Biotechnology**, v. 38, p. 109-116, 1995b.

ZACHAROF, M. P.; LOVITT, R. W.; RATANAPONGLEKA, K. Optimization of Growth Conditions for Intensive Propagation, Growth Development and Lactic Acid Production of Selected Strains of 'Lactobacilli'. In: Engineering Our Future: Are We up to the Challenge?. P. 27-30, 2009.

ZCHOERPER, O. P. **A cevada brasileira e o processo de malteação**. Porto Alegre, v. 1. 1990. 60p.

Zhang, Y.; CHEN, X.; LUO, J.; Qi, B.; WAN, Y. Na eficiente process for lactic acid production from wheat straw by a newly isolated *Bacillus coagulans* strain IPE22. **Bioresource Technology**, v. 158, p. 396-399, 2014.

ZHAOXIA, L.; JINLONG, Y.; DAN, S.; CHENG, D. Thechniques optimization of combined enzymatic hydrolysis on brewers' spent grain from Novozymes. **Journal of Life Sciences**, v. 6, p. 1232-1236, 2012.

ZUPANCIC, G. D.; SKRJANEC, I.; LOGAR, R. M. Anaerobic co-digestion of excess brewery yeast in a granular biomass reactor to enhance the production of biomethane. **Bioresource Technology**, n. 124, p. 328-337, 2012.

ZUPPARDO, B. Uso da goma Oenogum para a estabilização coloidal e de espuma em cerveja. **Dissertação de Mestrado** (Ciência e Tecnologia de Alimentos). Universidade de São Paulo, USP, 2010.

Capítulo 11

Apêndice

11.1 CURVA PADRÃO DO MÉTODO DO DNS PARA DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ART

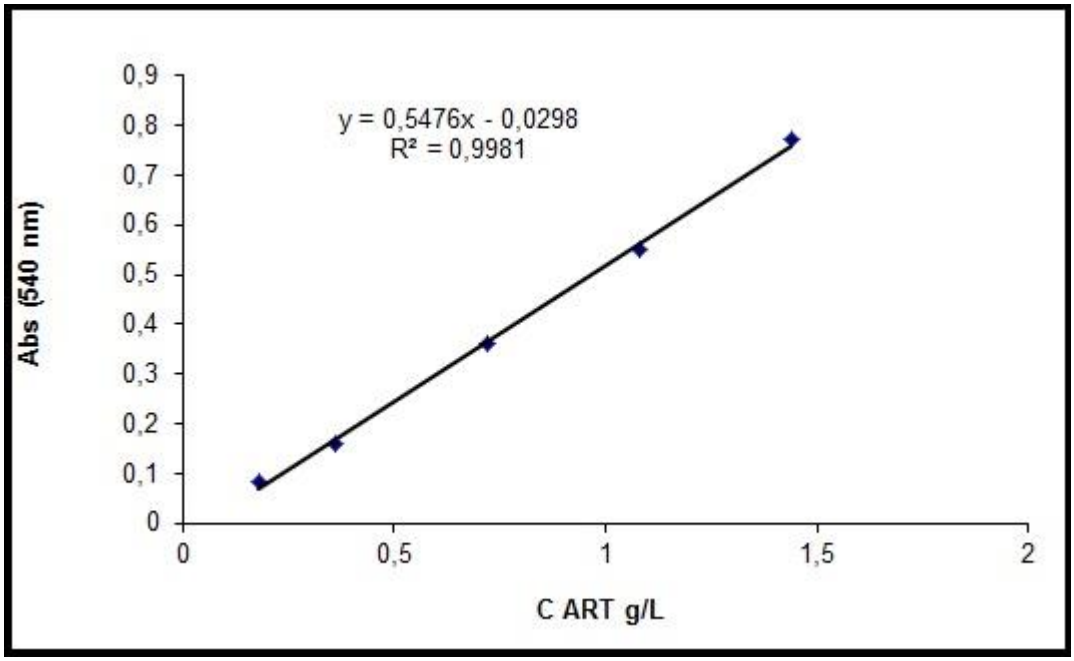

Figura A1: Curva padrão do método do DNS

Capítulo 12

Produção científica

12.1 ARTIGOS PUBLICADOS

MATHIAS, T. R. S.; MELLO, P. P. M.; SERVULO, E. F. C. Solid wastes in brewing process: A review. **Journal of Brewing and Distilling**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2014.

MATHIAS, T. R. S.; MELLO, P. P. M.; SERVULO, E. F. C. Nitrogen compounds in brewing wort and beer: A review. **Journal of Brewing and Distilling**, v. 5, n. 2, p. 10-17, 2014.

12.2 ARTIGOS ACEITOS (EM PROCESSO DE REVISÃO)

MATHIAS, T. R. S.; ALEXANDRE, V. M. F.; CAMMAROTA, M. C.; MELLO, P. P. M.; SERVULO, E. F. C. Characterization and determination of brewer's solid wastes composition. **Journal of the Institute of Brewing**.

12.3 ARTIGOS EM FASE DE ELABORAÇÃO

MATHIAS, T. R. S.; AGUIAR, P. F.; SILVA, J. B. A.; MELLO, P. P. M.; SERVULO, E. F. C. Use of brewery wastes for lactic acid bacteria cultivation: Their potential to lactic acid and proteolytic enzymes production.