



O uso do bagaço de malte proveniente da indústria cervejeira para obtenção de açúcares fermentáveis

Luciana Luft¹, Juliana R. F.da Silva¹, Leandro B. Werle¹, Marcio A. Mazutti¹

¹ Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, 1000, Santa Maria, 97105-900, Brasil (luciana.luft@ymail.com)

Resumo

A importância da utilização de resíduos agroindustriais na produção de biocombustíveis vem sendo cada vez mais destacada. Sua utilização não surgiu apenas como uma alternativa para a obtenção de uma matriz energética menos poluente, mas também, como meio de reduzir o acúmulo destes no meio ambiente. O bagaço de malte é um subproduto sólido da produção de cerveja, sendo gerado por volta de 14-20 kg de bagaço úmido para cada 100 litros de cerveja. Este subproduto apresenta por volta de 20-30% em peso seco de amido que pode ser convertido em açúcares fermentáveis pelo processo de hidrólise e posteriormente fermentados para a produção de etanol. Deste modo, o objetivo do presente trabalho foi realizar o estudo da hidrólise enzimática do bagaço de malte seco empregando um planejamento do tipo DCCR avaliando 3 variáveis: concentração de enzima, temperatura e concentração de substrato. A produção de açúcares fermentáveis variou de 24,4 a 75,5 g.kg⁻¹ de bagaço seco. As maiores produções de açúcares foram verificadas para as maiores condições empregadas de concentração de enzima, temperatura e concentração de substrato. Os resultados obtidos são promissores pela quantidade de açúcares produzidos mostrando o potencial do resíduo empregado.

Palavras-chave: Resíduos agroindustriais. Bagaço de malte. Açúcares fermentáveis.

Área Temática: Resíduos Sólidos

The use of malt bagasse from the brewery industry to obtain fermentable sugars

Abstract

The importance of using agricultural residues in the production of biofuels is becoming more prominent. Its use not only emerged as an alternative for obtaining a less polluting energy sources, but also as a means of reducing the accumulation thereof on the environment. The malt bagasse is a solid byproduct of beer brewing, being generated around 14-20 kg of wet bagasse per 100 liters of beer. This byproduct has around 20-30% by dry weight of starch that can be converted into fermentable sugars by the hydrolysis process and subsequently fermented to ethanol production. Thus, the objective of this work was the study of enzymatic hydrolysis of malt bagasse dry employing a planning type CCRD evaluating three variables: enzyme concentration, temperature and substrate concentration. The production of fermentable sugars ranged from 24.4 the 75.5 g.kg⁻¹ dry bagasse. The highest yields of sugars were checked for better conditions employed enzyme concentration, temperature and substrate concentration. The results are promising for the amount of sugar produced showing the potential employee residue.

Key words: Agroindustrial residues. Malt bagasse. Fermentable sugars.

Theme Area: Solid waste



1 Introdução

A demanda energética atual enfrenta atualmente uma dependência dos combustíveis fósseis, como carvão, gás e petróleo. Aproximadamente 80% do consumo mundial de energia se origina destas fontes; o consumo apresenta um crescimento anual de cerca de 2% (20 anos) e cresceu 3,1% ao ano nos últimos 5 anos (GOLDEMBERG, 2008). Os efeitos ambientais causados pelo uso destes combustíveis e o seu provável desabastecimento futuro têm gerado grande preocupação e promovido uma revolução no desenvolvimento e uso de energias alternativas. Há também outro elemento essencial para a subsistência humana que provavelmente ficará escasso em um futuro próximo, os alimentos. Estes fatores instigam a busca por outros meios alternativos de fonte de recursos para obtenção de alimentos e combustíveis. É nítido que a biomassa será a principal fonte para a obtenção destes elementos (REYES, 1998).

Atualmente, a utilização de subprodutos agroindustriais para a obtenção de biocombustíveis surge como estratégia para melhorar e diminuir o consumo elevado de fontes de energia fósseis. Os subprodutos utilizados para este fim são aqueles não destinados a alimentação humana, de modo que não haja competição entre produção de bioetanol e alimentação (EL ZAWAWY et. al., 2011). O uso desses resíduos agroindustriais além de ser uma solução viável para a produção de energia renovável impede a sua acumulação, o que representa um ganho ambiental devido ao potencial de contaminação de águas subterrâneas e rios que esse material possui (LEITÃO et. al, 2010).

O bagaço de malte é um subproduto sólido da produção de cerveja produzido a partir de filtração do mosto antes da fervura. A composição do bagaço de malte pode variar com alguns fatores como a variedade de cevada, o momento da colheita, as características de lúpulo e de outros adjuntos adicionados, e com a tecnologia de produção da cerveja (SANTOS et. al., 2013). Este subproduto é constituído principalmente de restos das cascas e da polpa dos grãos de malte e também de alguns aditivos, tais como milho, arroz e trigo. O bagaço de malte é quantitativamente o principal subproduto do processo cervejeiro, sendo gerado 14-20 kg cada 100 litros de cerveja produzida (CORDEIRO et. al., 2013). O malte moído é considerado o subproduto mais importante da indústria de cerveja com 85% do produto total gerado. Além disso, o Brasil é o terceiro maior produtor de cerveja do mundo, com uma produção de 12,6 milhões de litros, atrás apenas da China (40 milhões de litros) e Estados Unidos (35 milhões de litros) (MELLO; MALLI, 2014). A polpa contém umidade em torno de 75-80% e 9,92% de fibra bruta. A composição típica da fibra é de cerca de 16,78% de celulose, 28,42% hemicelulose, lignina e 27,78% (CORDEIRO et. al., 2013).

Além da fracção lignocelulósica presente no bagaço de malte, há um outro tipo de carboidrato que pode ser hidrolisado a açúcar fermentável, o amido. Podemos considerar três classes gerais de matérias-primas derivadas de biomassa que são apropriadas para a produção, por exemplo, de combustíveis renováveis: matérias-primas amiláceas (incluindo os açúcares), matérias-primas de triglicérides e matérias-primas lignocelulósicas. Matérias-primas amiláceas são aquelas compostas por polissacarídeos de glicose unidas por ligações glicosídicas, como amilose e amilopectina, que são facilmente hidrolisados para monômeros de açúcar, tornando-os acessíveis a fermentação (ALONSO; BOND; DUMESIC, 2010).

A hidrólise deste tipo de material pode se dar por via química ou enzimática. Mesmo que a hidrólise ácida apresente maior eficiência e possua um menor custo, gera resíduos poluentes, e na maioria das vezes, produtos que inibem a posterior fermentação. Por este motivo, a sacarificação enzimática tem sido objeto de estudos, já que processos enzimáticos oferecem potencial de redução de custos a longo prazo (MOSCON, 2014). Os mecanismos responsáveis para os efeitos benéficos de mistura e agitação mecânica durante a hidrólise enzimática ainda não são bem compreendidos. Kristensen et. al. (2009) e Hsieh (2014)



sugeriram que a agitação evita o acúmulo de produto e, portanto, neutraliza uma possível inibição do produto final. Pode-se também especular que a agitação aumenta a velocidade de hidrólise, contribuindo para a deslocalização das enzimas do recalcitrante para regiões degradáveis do substrato (HIMMEL et. al., 2007).

O aumento da eficiência a partir de uma melhoria na hidrólise de amido pode ser conseguido usando preparações multi-enzimáticas. Alguns relatórios sugerem os benefícios de utilização de tais sistemas enzimáticos. A produção de etanol aumentada utilizando hidrolisados de resíduos de amido de mandioca com uma preparação de multi-enzimas que consiste em celulase, D-xilanase, β -D-glicosidase, α -amilase, amiloglucosidase e pectinase (SHAMALA; SREEKANTIAH, 1986)

O principal objetivo deste trabalho foi investigar a hidrólise enzimática do amido do bagaço de malte usando agitação mecânica com um complexo de enzimas comercial para a obtenção de açúcares fermentáveis. Um delineamento composto central rotacional (DCCR) foi realizado para avaliar os efeitos da temperatura, concentração de enzima e concentração de substrato.

2 Materiais e Métodos

2.1 Materiais

O bagaço de malte foi gentilmente cedido por uma cervejaria local, Província (Santa Maria, RS, Brasil). Depois de obtida, as amostras foram imediatamente secas (120 h) a 60 ° C em circulação de ar (Fanen, SP, Brasil), e moídas a partículas < 2 mm. (Marconi, SP, Brasil). O complexo amilolítico utilizado foi STARGENT™ 002 (GENENCOR) que contém *Aspergillus kawachi* alfa-amilase expressa em *Trichoderma reesei* e um gluco-amilase de *Trichoderma reesei* que trabalham sinergicamente para hidrolisar o amido do substrato à glicose.

2.2 Equipamento e procedimento experimental

O biorreator usado neste trabalho constitui-se por um recipiente encamisado de vidro com um volume de 2 L equipado de um agitador mecânico (IKA EUROSTAR @ 200 control P4). A temperatura foi controlada com um banho termostático e a velocidade de rotação foi mantida a 100 rpm durante todo o tempo de reação. As reações foram realizadas considerando um volume de trabalho de 1 L de água destilada com diferentes quantidades de matéria-prima. Inicialmente, a água destilada e a matéria-prima foram adicionadas ao biorreator. O pH da solução não precisou ser ajustado, uma vez que estava entre 4,0-4,5, considerado pH ótimo do complexo enzimático. Depois de estabilizada a temperatura, uma quantidade de STARGENT™ 002 foi adicionada de acordo com o planejamento experimental (Tabela 1) e o tempo de reação foi de 240 minutos sob agitação de 100 rpm. No final da reação, uma alíquota foi retirada do biorreator e após filtrada em papel filtro (Qualy). A quantidade de açúcares redutores totais (ART) liberados pela hidrólise foi medida a partir do sobrenadante. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

2.3 Determinação de açúcar fermentável

No final da reação uma alíquota do hidrolisado foi filtrada em papel filtro e o sobrenadante usado para determinar a quantidade de açúcares fermentáveis pelo método ácido 3,5-dinitrosalicílico (MILLER, 1959). Todos os resultados foram expressos como massa de açúcar (glicose equivalente) por massa de material seco (BENZAZZI, 2013).

2.4 Planejamento experimental

As influências da concentração de substrato, temperatura e concentração de enzima



foram avaliadas por meio de um delineamento composto central rotacional (DCCR) para três variáveis independentes, para um total de 17 ensaios. Os intervalos das variáveis investigadas estão listados na Tabela 1. Os resultados foram analisados utilizando o software Statistica 10 (Stasoft Inc., Tulsa, EUA), considerando um nível de significância de 95%.

Tabela 1. Níveis de variáveis independentes investigadas no delineamento composto central rotacional

Níveis codificados	x_1 (wt%)	x_2 (°C)	x_3 (g.l ⁻¹)
-1.68	1	30	50
-1	2.8	38.1	80
0	5.5	50	125
1	8.2	61.9	170
1.68	10	70	200

x_1 : concentração de enzima; x_2 : temperatura; x_3 : concentração de substrato

3. Resultados e discussão

A Tabela 2 apresenta os resultados experimentais obtidos no DCCR durante a hidrólise do bagaço de malte em termos de ART liberados na hidrólise. A partir dos resultados pode ser visto que, dependendo da condição experimental utilizada uma variação considerável na quantidade de açúcares fermentáveis é verificada. De um modo geral, os valores ficaram dentro da faixa de 24,4 a 75,5 g.kg⁻¹ de bagaço seco. Os melhores resultados foram obtidos nos ensaios 8 e 14, que foram de 75,5 e 63,0 g.kg⁻¹, respectivamente.

Tabela 2. Matriz dos resultados experimentais obtidos no DCCR, 2³

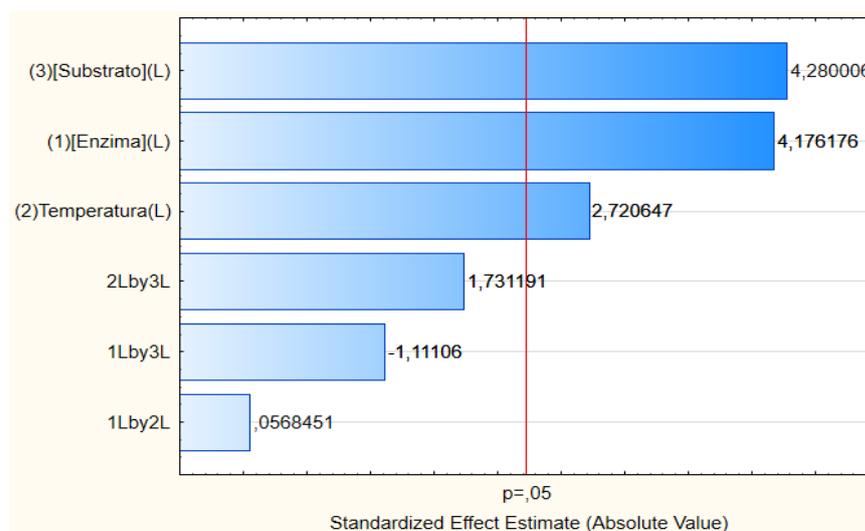
Ensaio	x_1	x_2	x_3	ART (g.kg ⁻¹)
1	-1	-1	-1	24.4
2	1	-1	-1	58.0
3	-1	1	-1	33.5
4	1	1	-1	50.4
5	-1	-1	1	43.5
6	1	-1	1	49.1
7	-1	1	1	52.1
8	1	1	1	75.5
9	-1.68	0	0	33.0
10	1.68	0	0	48.5
11	0	-1.68	0	32.3
12	0	1.68	0	51.5



13	0	0	-1.68	30.7
14	0	0	1.68	63.0
15	0	0	0	50.2
16	0	0	0	53.0
17	0	0	0	48.9

Para melhor avaliar os efeitos das variáveis independentes sobre a quantidade de açúcares fermentáveis liberada, uma análise estatística foi realizada utilizando o software Statistica 10 (Stasoft Inc., Tulsa, EUA). Os dados da Tabela 2 foram utilizados para calcular os seus efeitos, que são apresentados na Fig. 2. Como pode ser visto a partir desta figura, a concentração de substrato, concentração de enzima e temperatura têm um efeito linear positivo significativo sobre a hidrólise enzimática. Isto é, quanto maiores os valores empregados dentro da faixa estudada das variáveis independentes, maior a produção de açúcares fermentescíveis ($p < 0,05$).

Figura 2 - Gráfico de Pareto



Os dados da Tabela 2 foram utilizados para estimar os parâmetros do modelo quadrático (eq. (1)), cujos parâmetros representam os efeitos das variáveis independentes sobre as respostas estudadas (concentração de ART liberado). No que diz respeito à concentração de ART liberado, os termos lineares para a concentração de enzima, a temperatura, e a concentração de substrato mostrou um efeito positivo significativo. Nenhum efeito quadrático e de termos de interação apresentou efeito significativo positivo ($p < 0,05$) na faixa investigada.

$$\text{ART} = 46,92 + 15,47x_1 + 10,08x_2 + 15,85x_3 + 0,28x_1 x_2 - 5,38x_1 x_3 + 8,38 x_2 x_3 \quad \text{eq. (1)}$$

A tabela de análise de variância - ANOVA (Tabela 3) foi aplicada para validar os parâmetros do modelo referentes à concentração de ART liberado.



Tabela 3 - Análise de variância (ANOVA)

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrado médio	F _{cal}
Regressão	2218,436	6	369,74	79
Resíduos	468,069	10	4,68	
Total	2686,505	16	167,91	

(R²)= 82,58; F_{tab (6;10;0,05)}= 3,22

O valor de F-calculado para o modelo referindo-se à concentração de ART liberado foi 79; esse valor é de aproximadamente 26 vezes maior do que o tabelado. O coeficiente de regressão R² foi 0,82577 indicando que cerca de 82% do total das variações nos dados experimentais são explicados pelo modelo. Com base na análise de variância, conclui-se que o modelo é estatisticamente significativo, proporcionando as respostas fiáveis como funções de variáveis independentes, e por isso essa ferramenta estatística é útil para a otimização do processo.

As Figuras 4 e 5 apresentam a influência da concentração de enzima e da concentração de substrato sobre a produção de ART, ambas variáveis mais significativas no processo. O máximo rendimento obtido para as maiores concentrações de substrato e maiores concentrações de enzima. Gasparotto et. al. (2015) realizaram a hidrólise do bagaço de cana assistida por ultrassom com enzimas celulolíticas e verificaram uma maior produção de açúcar fermentável em concentrações de enzima mais altas. Leaes et. al. (2013) realizaram a hidrólise enzimática assistida por ultrassom dos resíduos de mandioca usando enzimas amilolíticas e também observaram um aumento no rendimento de ART em concentrações de enzima acima de 8,0%.

Figura 4- Superfície de Resposta

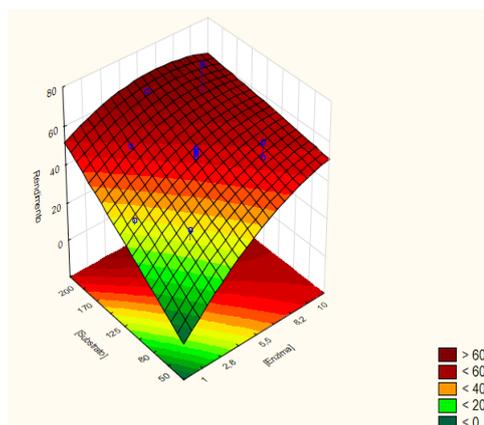
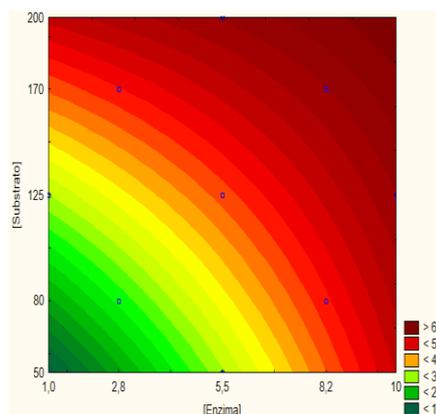


Figura 5- Superfície de contorno



4. Conclusões

A hidrólise enzimática do bagaço de malte provou ser eficaz para obtenção de açúcares fermentáveis com a utilização de um método não dispendioso e simples de agitação mecânica, ou seja, sem o uso de pré-tratamento do substrato ou de tecnologias alternativas. A concentração máxima de ART alcançado na hidrólise enzima foi de 75,5 g.kg⁻¹, valor considerado relevante por tratar-se de uma matéria-prima resultante de uma hidrólise anterior. As condições experimentais ótimas para hidrólise de amido a partir de bagaço de malte foram



8,2 % de enzima, a concentração de substrato de 170 g.l⁻¹, a temperatura de 70 ° C e 4 horas de tempo de reação após a adição do complexo enzimático.

5. Referências

ALONSO, D. M.; BOND J. Q.; DUMESIC J.A.. Catalytic conversion of biomass to biofuels. **Green Chemistry** (2010) Disponível em: <www.rsc.org/greenchem> Acesso: 30 de novembro de 2015.

BENAZZI T.; CALGAROTO S.; ASTOLFI V.; DALLA ROSA C.; OLIVEIRA J. V.; MAZUTTI M. A. Pretreatment of sugarcane bagasse using supercritical carbon dioxide combined with ultrasound to improve the enzymatic hydrolysis. **Enzyme and Microbial Technology** 52 (2013), pp. 247-250.

CORDEIRO L. G.; EL-AOUAR A. A.; ARAÚJO C. V. B. de. Energetic characterization of malt bagasse by calorimetry and thermal analysis. **J Therm Anal Calorim** (2013) 112:713–717.

EL-ZAWAWY, W.K.; IBRAHIM, M.M.; ABDEL-FATTAH, Y.R.; SOLIMAN, W.A. Acid and enzyme hydrolysis to convert pretreated lignocellulosic materials into glucose for ethanol production. **Carbohydr. Polym.** (2011) 84, pp. 865–871.

GASPAROTTO, J. M.; WERLE, L. B.; MAINARDI M. A.; FOLETTO E. L.; KUHN R. C.; JAHN S. L.; MAZUTTI M. A. Ultrasound-assisted hydrolysis of sugarcane bagasse using cellulolytic enzymes by direct and indirect sonication. **Biocatal. Agric. Biotechnol.** (2015).

GOLDEMBERG, J. Em **Bioenergia no Estado de São Paulo**, Nigro, F.E.B.; Coelho, S. T., Eds.; Imprensa Oficial do Estado de São Paulo, p. 110. São Paulo 2008.

HIMMEL M. E.; DING S. Y.; JOHNSON D. K.; ADNEY W. S.; NIMLOS M. R., et al. Biomass recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production. **Science** (2007) 315: 804–807.

HSIEH C.; CANNELLA D.; JORGENSEN H.; FELBY C.; THYGESEN C. L. G. Cellulase inhibition by high concentrations of monosaccharides. **J Agric Food Chem** (2014) 62: 3800–3805.

KRISTENSEN J. B.; FELBY C.; JORGENSEN H. Yield-determining factors in high solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. **Biotechnol Biofuels** 2, (2009).

LEAES E. X.; ZIMMERMANN E.; SOUZA M.; RAMON A. P.; MEZADRI E. T.; DAL PRÁ V.; TERRA L. M.; MAZUTTI M. A. Ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis of cassava waste to obtain fermentable sugars. **Biosystems Engineering** 115 (2013) pp. 1-6.

LEITÃO, V. F.; GOTTSCHALK, L. M. F.; FERRARA M. A.; NEPOMUCENO, A. L.; MOLINARI, H. B. C.; BOM, E. P. S. Biomass Residues in Brazil: Availability and Potential Uses. **Waste Biomass Value** (2010) v. 1, pp. 65-76.



MELLO L. R. P. F.; MALLI S. Use of malt bagasse to produce biodegradable baked foams made from cassava starch. **Industrial Crops and Products**, 55 (2014), pp. 187-193.

MOSCON, J. M. **Hidrólise ácida e enzimática de casca de arroz usando tecnologias alternativas**. 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Processos) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2014.

MILLER G.L. Use of dinitrosalicylic acid and reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.**, 31 (1959), pp. 426–427.

REYES, J; ZAMORA, P. P; DURÁN, N. Hidrólise Enzimática de casca de arroz utilizando-se celulases. Efeito de tratamentos Químicos e Fotoquímicos. **Química Nova**, 21 (2) 1998.

SANTOS M.; JIMÉNEZ J. J.; BARTOLOMÉ B.; NOZAL M. J. del. Variability of brewer's spent grains within a brewery. **Food Chemistry**, 2013 80(1), pp. 19-21C.

SHAMALA T. R.; SREEKANTIAH K. R. Saccharification of tapioca starch residue with a multienzyme preparation of *Aspergillus ustus*. **Starch**, (1986) 38(12):428-4.