



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

Rafael Limongi de Souza

**APROVEITAMENTO DE RESÍDUO DE LEVEDURA CERVEJEIRA
COMO FONTE DE NUTRIENTES PARA O CULTIVO DE *Bacillus* sp.**

JOÃO PESSOA
2016

Rafael Limongi de Souza

**APROVEITAMENTO DE RESÍDUO DE LEVEDURA CERVEJEIRA
COMO FONTE DE NUTRIENTES PARA O CULTIVO DE *Bacillus* sp.**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado à Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso, do Curso Superior em Bacharelado em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba – UFPB, como requisito para obtenção do Título de Biotecnologista.

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. Andréa Farias de Almeida

JOÃO PESSOA/PB
2016

S729a Souza, Rafael Limongi de.
Aproveitamento de resíduo de levedura cervejeira como fonte de nutrientes para o cultivo de *Bacillus sp.* / Rafael Limongi de Souza.- João Pessoa, 2016.
50f. : il.
Orientadora: Andréa Farias de Almeida
Trabalho de Conclusão de Curso - TCC (Graduação) - UFPB/CB
1. Biotecnologia. 2. Levedo de cerveja. 3. Resíduo de cervejaria. 4. Fermentação submersa. 5. Fonte alternativa - nitrogênio. 6. Extrato de levedura.

UFPB/BC

CDU: 62:577.1(043.2)

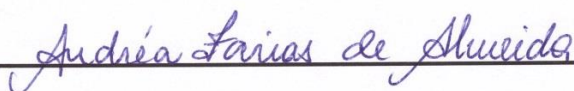
Rafael Limongi de Souza

**APROVEITAMENTO DE RESÍDUO DE LEVEDURA CERVEJEIRA
COMO FONTE DE NUTRIENTES PARA O CULTIVO DE *Bacillus* sp.**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) submetido ao Curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Aprovado em: 25 de novembro de 2016.

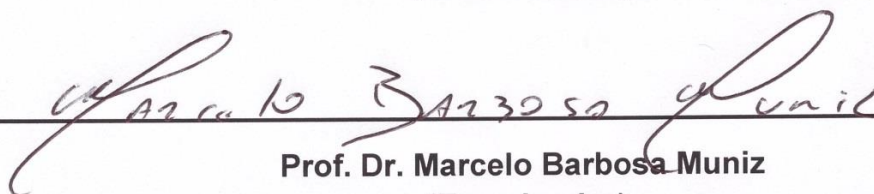
BANCA EXAMINADORA:



Prof^ª. Dr^ª. Andréa Farias de Almeida
(Orientadora)



Prof^ª. Dr^ª. Adna Cristina Barbosa de Sousa
(Examinadora)



Prof. Dr. Marcelo Barbosa Muniz
(Examinador)

Dedico este trabalho à minha família por todo apoio, carinho e presença em toda minha jornada na graduação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter permitido que eu tivesse a oportunidade em ingressar em uma Universidade Federal, e por ter tido o luxo em ter apenas os estudos como atividade principal.

Também agradeço aos meus pais, Marcos e Lourdes, que sempre me apoiaram e incentivaram em minhas decisões, além de terem me educado da melhor forma possível.

Aos meus irmãos, Rodrigo, Leonnardo, Brunno e Giulia Limongi.

À Lays, pelo apoio e companheirismo durante toda a graduação.

Aos meus amigos, que compartilharam e também auxiliaram direta e indiretamente este trabalho.

Aos meus professores do Centro de Biotecnologia, que foram de fundamental importância para minha formação profissional, em especial a professora Sildivane Valcácia Silva, que me acompanhou por dois anos em projetos de iniciação científica, a qual agradeço imensamente pelos ensinamentos, e ao professor Enéas Ricardo, pelo amadurecimento crítico, e auxílio na tomada de decisões.

Pela realização deste trabalho agradeço imensamente:

À minha orientadora, professora Andréa Farias de Almeida pela oportunidade e por toda atenção dedicada a me orientar e apoiar durante o TCC.

Ao meu co-orientador, professor Kristerson de Luna Freire, pela oportunidade e atenção durante os experimentos.

Aos meus amigos do LEBp pelo auxílio durante os experimentos.

À minha banca avaliadora, Adna C. B. de Souza e Marcelo Barbosa Muniz, pela disponibilidade em contribuir para o enriquecimento deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Curva de crescimento microbiano em cultivo descontínuo, representada em ordenadas lineares (A) e semilogarítmica (B). (Fonte: HISS, 2001) | 20 |
| Figura 2. Curvas de ajuste de resultados de uma experiência idealizada de fermentação. X, P e S são as concentrações do microrganismos, produto e substrato residual no meio, respectivamente. (Fonte: HISS, 2001). | 21 |
| Figura 3. Biomassa centrifugada de levedura residual cervejeira..... | 27 |
| Figura 4. Esquema do processo de limpeza (lavagens) e desamargamento de biomassa de levedura (<i>Sacharomyces cerevisiae</i>) proveniente de cervejaria artesanal (SGARBIERI et al. 1999, modificado). Fonte: Autor..... | 28 |
| Figura 5. Biomassa desamargada em béquer (500 mL), para realização da autólise. | 29 |
| Figura 6. Esquema da autólise da biomassa desamargada (SGARBIERI et al., 1999, modificado). Fonte: Autor | 30 |
| Figura 7. Extrato de levedura solúvel pós-evaporação em rotaevaporador. | 31 |
| Figura 9. pH referente ao meio de cultura composto com extrato de levedura cervejeira acrescido de amônio (Grupo B). | 38 |
| Figura 10. pH referente ao meio de cultura composto com extrato de levedura cervejeira (Grupo C)..... | 39 |
| Figura 11. Curva de crescimento do <i>Bacillus</i> sp. do cultivo de 48 horas, utilizando como fonte de nitrogênio extrato de levedura comercial comparado ao consumo de substrato (Grupo A)..... | 40 |
| Figura 12. Linha de tendência linear para obtenção do $\mu_{\text{máximo}}$ para o grupo A. | 40 |
| Figura 13. Curva de crescimento do <i>Bacillus</i> sp. do cultivo de 60 horas, utilizando como fonte de nitrogênio extrato de levedura cervejeira acrescida de amônio comparado ao consumo de substrato (Grupo B)..... | 41 |
| Figura 14. Linha de tendência linear para obtenção do $\mu_{\text{máximo}}$ para o grupo B..... | 41 |
| Figura 15. Curva de crescimento do <i>Bacillus</i> sp. do cultivo de 60 horas, utilizando como fonte de nitrogênio extrato de levedura cervejeira comparado ao consumo de substrato (Grupo C). | 42 |
| Figura 16. Linha de tendência linear para obtenção do $\mu_{\text{máximo}}$ para o grupo C. | 42 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Classificação taxonômica do <i>Bacillus sp.</i> | 17 |
| Tabela 2. Taxonomia da levedura | 24 |
| Tabela 3. Composição centesimal aproximada do extrato de levedura de resíduo de cervejaria | 25 |
| Tabela 4. Composição do meio Luria-Bertani | 32 |
| Tabela 5. Composição meio de cultura mineral..... | 33 |
| Tabela 6. Composição do meio de cultura utilizado no inóculo | 33 |
| Tabela 7. Caracterização do extrato de levedura cervejeira..... | 36 |
| Tabela 8. Valores do fator de conversão de substrato em células (Y_x/s) e produtividade em células (P_x), para todos os grupos experimentais. | 43 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------------------------------------|-----------------------------------------------|
| $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ | Sulfato de amônio |
| $^{\circ}\text{C}$ | Grau Celsius |
| CERVBRASIL | Associação Brasileira da Indústria da Cerveja |
| DNS | Ácido dinitro-salicílico |
| D.O. | Densidade ótica |
| g | Gramas |
| g_x/g_s | Gramas de células por gramas de substrato |
| K_2HPO_4 | Fosfato de potássio dibásico |
| KH_2PO_4 | Fosfato de potássio monobásico |
| L | Litros |
| $\text{MgSO}_4 (7 \text{ H}_2\text{O})$ | Sulfato de magnésio heptahidratado |
| Mg | Miligrama |
| Min. | Minuto |
| mL | Mililitros |
| NaOH | Hidróxido de sódio |
| nm | Nanômetros |
| P_x | Produtividade em células |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| rpm | Rotações por minuto |
| $Y_{x/s}$ | Fator de conversão de substrato em células |
| $\mu_{\text{máximo}}$ | Velocidade específica máxima de crescimento |
| μ_x | Velocidade específica de crescimento |

GLOSSÁRIO

Biomassa - quantidade de matéria viva, presente em determinado *habitat*, comumente expressa como peso de organismos por unidade de área do *habitat*, ou como volume ou peso de organismos por unidade de volume do *habitat*.

Carbonatação – dissolução de CO₂ na cerveja afim de se obter espuma.

Fermentação - reação espontânea de um corpo orgânico pela presença de um fermento que o decompõe.

Flavour – combinação de sabor e odor.

Malte – produto da malteação; grão germinado a ser utilizado na fermentação.

Mosto – mistura açucarada destinada a fermentação alcoólica.

Resíduo – produtos remanescentes ou que restam ao fim de um processo.

Saprófito – organismo que obtêm nutrientes de matéria orgânica em decomposição.

Substrato – meio nutriente para o desenvolvimento de um organismo.

Trub – resíduo denso presente no mosto de fermentação da cerveja.

SUMÁRIO

| | |
|----------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 OBJETIVOS | 15 |
| 2.1 Objetivo geral | 15 |
| 2.2 Objetivos específicos | 16 |
| 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 16 |
| 3.1 Processo fermentativo submerso | 16 |
| 3.1.2 Microrganismos utilizados na fermentação submersa | 17 |
| 3.2 Meio de cultura | 17 |
| 3.2.1 Fontes de carbono e nitrogênio | 18 |
| 3.3 Crescimento microbiano | 19 |
| 3.3.1 Velocidades de crescimento | 22 |
| 3.4 Resíduo de cervejaria | 23 |
| 3.4.1 Indústria da cerveja | 23 |
| 3.4.2 Levedura | 24 |
| 3.4.3 Extrato de Levedura | 25 |
| 4. METODOLOGIA | 26 |
| 4.1 Preparo do resíduo | 26 |
| 4.1.1 Recuperação e desamargamento da biomassa | 27 |
| 4.1.2 Autólise e fracionamento da biomassa limpa e desamargada | 29 |
| 4.1.3 Purificação do extrato bruto solúvel | 30 |
| 4.1.1 Caracterização do resíduo | 31 |
| 4.2 Microrganismo | 32 |
| 4.2.1 Grupos avaliados | 32 |
| 4.2.2 Inóculo | 33 |
| 4.2.3 pH das amostras | 34 |
| 4.3.4 Quantificação de biomassa | 34 |
| 4.3.5 Quantificação do substrato | 34 |
| 4.3.6 Determinação dos parâmetros cinéticos | 35 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 36 |
| 5.1 Caracterização do resíduo | 36 |
| 5.2 pH das amostras | 37 |
| 5.3 Crescimento bacteriano | 40 |
| 6. CONCLUSÃO | 44 |
| REFERÊNCIAS | 46 |

RESUMO

O Brasil produz cerca de 2,5 milhões de toneladas/ano de resíduos úmidos (bagaço de malte e levedura residual) oriundos de cervejarias. A levedura residual de cervejaria possui cerca de 70-80% de umidade, 45-50% de proteínas totais e 10-20% de nitrogênio solúvel, sendo uma possível fonte de compostos nitrogenados. O objetivo deste trabalho foi processar o resíduo de levedura cervejeira visando seu aproveitamento como fonte nutricional para crescimento do microrganismo *Bacillus sp.* em fermentação submersa. O resíduo úmido de cervejaria foi recuperado, desamargado, autolisado, fracionado e seu extrato bruto foi purificado. O resíduo foi caracterizado quanto ao pH, composição de nitrogênio e proteína total. Após preparação do resíduo, este foi acrescentado em meios de cultura. Neste experimento, foi realizada fermentação submersa com três grupos diferindo na fonte de nitrogênio: Grupo A (extrato de levedura comercial), Grupo B (extrato de levedura cervejeira + amônio) e Grupo C (extrato de levedura cervejeira). As amostras foram avaliadas quanto o pH, peso seco e consumo de substrato. Foram calculados o $\mu_{\text{máximo}}$, P_x e $Y_{x/s}$. O extrato de levedura cervejeira apresentou em sua caracterização 4,5% de nitrogênio total e 39% de proteína total, com pH de 6,41. Durante a fermentação houve diminuição do pH para os Grupos A e B. O Grupo C preservou o pH entre 6,6 e 6,8. Analisando-se os parâmetros, o Grupo A apresentou maior valor para o $\mu_{\text{máximo}}$ e os Grupos B e C, mesmo utilizando um resíduo, apresentaram o $Y_{x/s}$ semelhantes aos do controle. Os Grupos B e C apresentaram P_x superiores ao Grupo A. Esses resultados evidenciam que o uso de levedura cervejeira tem potencialidade como fonte de nitrogênio orgânico no processo de fermentação submersa por *Bacillus sp.*

Palavras-chave: Levedo de cerveja. Resíduo de cervejaria. Fermentação submersa. Fonte alternativa de nitrogênio. Extrato de levedura.

ABSTRACT

Brazil produces about 2.5 million tons / year of wet waste from breweries. Brewer's yeast residue has about 70-80% moisture, 45-50% total protein and 10-20% soluble nitrogen, being a possible source of nitrogen compounds. The objective of this work was to process the brewer's yeast residue to be used as a nutritional source for the growth of the *Bacillus sp.* in submerged fermentation. The wet brewery residue was recovered, autolysed, fractionated and its crude extract purified. The residue was characterized in terms of pH, nitrogen composition and total protein. After preparation of the residue, it was added in culture media. In this experiment, submerged fermentation was carried out with three groups differing in the nitrogen source: Group A (commercial yeast extract), Group B (brewer's yeast extract + ammonium) and Group C (brewer's yeast extract). Samples were evaluated for pH, biomass and substrate consumption. Were calculated μ_{\max} , P_x e $Y_{x/s}$. The yeast extract presented in its characterization 4.5% of total nitrogen and 39% of total protein, with pH of 6.41. During fermentation there was a decrease in pH for Groups A and B, Group C preserved pH between 6.6 and 6.8. Analyzing the parameters, Group A presented higher value for μ_{\max} and Groups B and C, even using a residue, presented the $Y_{x/s}$ similar to those of the control. Groups B and C presented P_x higher than Group A. These results show that the use of brewer's yeast has potential as a source of organic nitrogen in the fermentation process submerged by *Bacillus sp.*

Keywords: Brewer's yeast. Brewery waste. Submerged fermentation. Alternative source of nitrogen. Yeast extract.

1 INTRODUÇÃO

A cerveja é uma bebida de ampla produção e consumo no mundo, conhecida desde os tempos remotos em diversos países. Na antiguidade, difundiu-se entre os povos da Suméria, Babilônia e Egito. A bebida chegou ao Brasil, trazida pela família real Portuguesa em 1808. Atualmente, se comparado a países como a Alemanha e República Tcheca, o Brasil apresenta baixo consumo *per capita*. Entretanto, este consumo vem aumentando ao longo dos anos (MEGA, NEVES e ANDRADE, 2011).

De acordo com o Sindicato Nacional da Indústria de Cerveja, o Brasil está ocupando no ranking global o terceiro lugar de produção desta bebida, com mais de 10 bilhões de litros/ano, perdendo apenas para China, Estados Unidos e Alemanha (CERVBRASIL, 2014). Segundo Matos (2011), o processo industrial de cerveja consiste em três etapas: preparo do mosto, que inclui moagem do malte, mosturação, filtração, fervura e clarificação, processo fermentativo e o acabamento da cerveja, o qual consiste em filtração, carbonatação, modificações no aroma, sabor e cor. No final do processo, além da cerveja, obtém-se o resíduo úmido cervejeiro, composto sólido da matéria prima usada na fermentação e a levedura que cresceu no meio (SANTOS & RIBEIRO, 2005). O Brasil produz cerca de 2,5 milhões de toneladas/ano de resíduos oriundos de cervejarias (STEFANELLO et al., 2014). O descarte desses resíduos no meio ambiente resulta em uma série de transtornos para o ecossistema, devido à sua rica composição em matéria orgânica (MATHIAS, MELLO e SERVULO, 2014).

O resíduo úmido cervejeiro é um subproduto do processamento de cerveja, geralmente, destinado para o uso em ração animal, ou até mesmo descartado diretamente ao solo ou em aterros sanitários. Todavia, devido às características de sua composição, apresenta significativo potencial para aplicação em bioprocessos (MATHIAS, MELLO e SERVULO, 2014). Atualmente, há uma crescente pressão pela redução dos subprodutos/resíduos de origem industrial, buscando-se novas alternativas para seu uso, visto que certos resíduos intrínsecos à produção de cerveja dificilmente têm redução de sua quantidade gerada, como o bagaço de malte, o *trub* (partículas densas sedimentadas no mosto cervejeiro) e a levedura residual cervejeira, onde o volume produzido não apresenta sazonalidade (BROCHIER e CARVALHO, 2009).

A levedura cervejeira é o microrganismo responsável pela conversão do mosto em cerveja. Durante o processo fermentativo, a massa da levedura tende a triplicar ou quintuplicar no biorreator (BRIGGS et al., 2004), promovendo a degradação dos açúcares do mosto e formação de etanol. Quando o processo fermentativo é encerrado, segue-se um período de repouso a baixas temperaturas, na qual ocorre a precipitação da biomassa celular. Esta biomassa é descartada na indústria quando não consegue ser reutilizada em novos ciclos fermentativos (MATHIAS, MELLO e SERVULO, 2014).

A levedura residual de cervejaria é a matéria orgânica que possui em sua composição de 70-80% de umidade, 45-50% de proteínas totais e 10-20% de nitrogênio solúvel (MATHIAS, MELLO e SERVULO, 2014; CABALLERO-CORDOBA e SGARBIERI, 2000), sendo uma possível fonte de compostos nitrogenados.

Os resíduos industriais vêm sendo utilizados em processos biotecnológicos de diversas formas. Os trabalhos mais abordados visam o uso de resíduos sólido do processamento rico em matéria orgânica, visando sua utilização como substrato (fonte de carbono) tanto em processos fermentativos em estado sólido quanto em submerso. Um exemplo desta aplicação de resíduos em processos fermentativos é a utilização do bagaço da cana-de-açúcar, que ao longo dos anos vem sendo explorado como substrato em meios de cultivo de microrganismos para geração de produtos industriais com valor agregado, como enzimas, antibióticos, massa proteica e biossurfactantes (MONTEIRO et al., 1991; BARRIOS-GONZÁLEZ et al., 1988).

Mediante o exposto, o objetivo deste trabalho foi preparar a levedura residual do processamento de cerveja artesanal, a fim de proporcionar a sua utilização como fonte de nitrogênio adequada para o cultivo de *Bacillus* sp.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Processar o resíduo de levedura cervejeira visando seu reaproveitamento como fonte nutricional para crescimento do microrganismo *Bacillus* sp.;

2.2 Objetivos específicos

- Realizar o processamento do resíduo de levedura cervejeira por autólise;
- Utilizar o resíduo processado de levedura cervejeira na composição do meio de cultura para o desenvolvimento do microrganismo *Bacillus* sp.;
- Determinar a biomassa obtida do *Bacillus* sp. através de métodos gravimétricos e ópticos nos dois sistemas propostos;
- Determinar os parâmetros cinéticos ($\mu_{\text{máximo}}$, fator de conversão de substrato em células e produtividade em células) do cultivo da linhagem de *Bacillus* sp.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Processo fermentativo submerso

Processo fermentativo pode ser definido como um conjunto de etapas, onde o meio de cultura esterilizado é preparado com o objetivo de fornecer ao microrganismo os nutrientes necessários para seu desenvolvimento. O processo de fermentação é controlado (pH, temperatura, agitação, concentração de nutrientes, entre outros limitantes) de modo a manter favorável esse crescimento e formação do produto desejado. Por último, completado o processo, o caldo fermentado passa pelos tratamentos finais, visando a separação dos produtos e subprodutos (BORZANI et al., 2008).

Segundo Alonso (2001), o processo fermentativo submerso tem como característica a utilização de meio de cultura líquido, onde os nutrientes propícios para o desenvolvimento do microrganismo se encontram solúveis. Este processo apresenta facilidade de cultivo em grande escala, garantindo homogeneidade do meio e facilidade de controle de parâmetros do processo (COUTO & SANROMÁN, 2006). Entretanto, Alonso (2001) cita que existe maior probabilidade de contaminação, além dos produtos extracelulares se encontrarem diluídos no meio, necessitando de etapas de purificação mais laboriosas.

3.1.2 Microrganismos utilizados na fermentação submersa

3.1.2.1 *Bacillus* sp.

As espécies do gênero *Bacillus* são bastonetes com extremidades retas ou arredondadas, de tamanhos variáveis, espiralados, Gram positivos ou Gram negativos. São geralmente saprófitos e não patogênicos para os animais (HOLT et al., 1994). A classificação taxonômica do *Bacillus* sp. está apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Classificação taxonômica do *Bacillus* sp.

| CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA | |
|---------------------------------|---------------------|
| Reino | <i>Bacteria</i> |
| Sub-reino | <i>Posibacteria</i> |
| Filo | <i>Firmicutes</i> |
| Classe | <i>Bacilli</i> |
| Ordem | <i>Bacillales</i> |
| Família | <i>Bacillaceae</i> |
| Gênero | <i>Bacillus</i> |
| Espécie | <i>Bacillus</i> sp. |

3.2 Meio de cultura

Nas condições artificiais de laboratório o crescimento de microrganismos é conseguido pela semeadura dos mesmos em meios de cultura, cuja composição deve atender as necessidades nutritivas de cada espécie. Devem ser considerados os nutrientes responsáveis pelo crescimento celular.

As fontes de carbono e nitrogênio são fatores limitantes no cultivo de microrganismos. O modo de aplicação e seleção de fontes de carbono são um dos fatores críticos dos processos fermentativos, pois muitos compostos, especialmente açúcares, podem causar intensa repressão catabólica da síntese de várias enzimas,

além da redução na velocidade de crescimento de determinados organismos (PINTO, 2008).

Os processos biotecnológicos são geralmente mais dispendiosos que os processos químicos convencionais, pois demanda matéria prima mais cara para a composição dos meios de cultura como aminoácidos, vitaminas e carboidratos. A composição de meio que atendam às necessidades nutricionais do microrganismo utilizado torna o processo mais caro. Contudo, a utilização de meios alternativos que atendam a suplementação nutricional e econômica pode tornar o processo de obtenção de bioprodutos mais competitivo no mercado industrial. Para tanto, os subprodutos/resíduos de processamento industrial com alto valor nutricional são uma alternativa barata e ecologicamente correta para serem utilizados nos processos biotecnológicos.

3.2.1 Fontes de carbono e nitrogênio

A maioria das bactérias é heterotrófica, exigindo fontes orgânicas de carbono para promover as reações bioquímicas do seu metabolismo originando produtos de interesse industrial. Das fontes de carbono, a mais comum são os carboidratos, particularmente a D-Glicose, embora outras fontes como os aminoácidos, ácidos monocarboxílicos, lipídios e até mesmo álcoois também podem ser utilizados como substrato (BORZANI et al., 2008).

O crescimento celular e o acúmulo de produtos metabólicos são fortemente influenciados pelos constituintes do meio como, por exemplo, a fonte de carbono e nitrogênio (PINTO, 2008). As fontes de carbono do meio podem influenciar a síntese de diversos metabólitos de interesse, como os biossurfactantes, antibióticos e complexos enzimáticos, por exemplo (PINTO, 2008).

No meio de cultura deve possuir também concentrações necessárias de fontes de nitrogênio. Há necessidade da presença de nitrogênio no crescimento da biomassa fermentativa (PINTO, 2008). Nos estudos de İççgen et al. (2002), eles relatam sobre a influência de diferentes fontes de nitrogênio em meio de cultura de *Bacillus thuringiensis*, que o crescimento e formação de produto do cultivo deste *Bacillus* é influenciada pela fonte de nitrogênio, seja ela orgânica ou inorgânica.

Dependendo da quantidade de nitrogênio fornecida ao meio de cultura a biomassa bacteriana aumentará ou diminuirá. Em meios de cultura para crescimento de *B. thuringiensis* var. *israelenses*, o meio de cultura industrial é rico em proteínas, tanto de origem animal quanto vegetal, afim de fornecer uma fonte rica em nitrogênio e de baixo custo, como é o caso do uso de extratos de soja, licor de milho, hidrolisados de caseína (PRABAKARAN e HOLT, 2008).

Ainda, estudos bioquímicos mostram que a composição do substrato, fonte de nitrogênio está relacionada particularmente com a diferenciação e esporulação das células na fase vegetativa de crescimento (ANDERSON e JAYRAMAN, 2003).

3.3 Crescimento microbiano

Considera-se como crescimento em sistemas biológicos, o aumento de massa resultando de um acréscimo ordenado de todos os componentes do protoplasma. Assim, os aumentos de tamanho em decorrência de fenômenos como absorção de água ou acúmulo de material de reserva não podem ser considerados como crescimento (BORZANI et al., 2008).

Ainda, o crescimento microbiano pode ser avaliado pelo aumento da massa celular ou pelo número de células, e é o resultado de uma série de eventos altamente coordenados e enzimaticamente catalisados. A expressão máxima do crescimento microbiano é dependente do transporte dos necessários nutrientes, fontes de carbono, nitrogênio, vitaminas e sais minerais, que se transferem às células e das condições ambientais do sistema de produção, como temperatura e pH, que devem ser mantidos em seus valores ótimos durante a fermentação (FALANGHE et al., 1975).

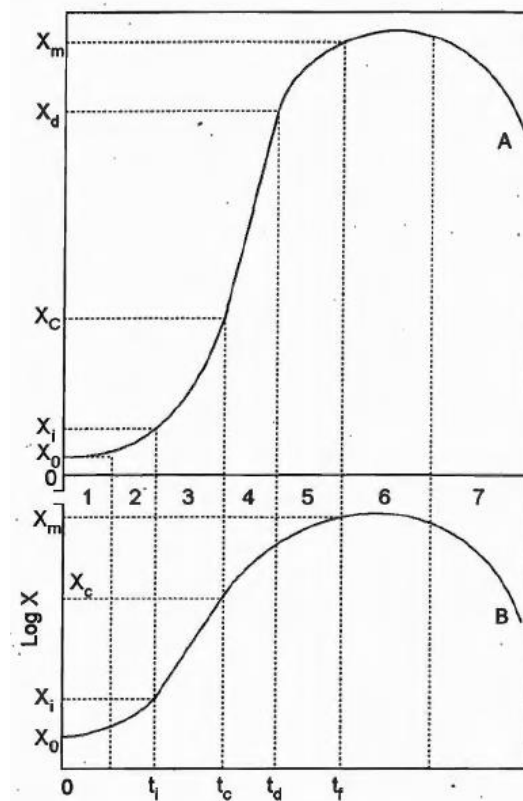
Quando o microrganismo é inoculado no meio de cultura favorável ao seu crescimento, observa-se um comportamento característico de concentração celular, que pode ser dividido em fases (HISS, 2001):

- Fase 1: latência, que segue imediatamente à inoculação do meio de cultura com o microrganismo de interesse. Este é um período de adaptação, durante o qual a célula sintetiza enzimas necessárias ao seu crescimento. Nesta fase não há reprodução celular. É apenas uma fase adaptativa;
- Fase 2: transição, onde se observa o início gradual da reprodução microbiana;

- Fase 3: logarítmica ou exponencial, em que a velocidade de crescimento é máxima;
- Fase 4: linear de crescimento, com velocidade de reprodução constante;
- Fase 5: desaceleração, devido ao esgotamento dos nutrientes do meio de cultura e ao acúmulo de inibidores, em que a velocidade de crescimento diminui até se anular;
- Fase 6: Os nutrientes estão ficando escassos e os produtos tóxicos estão se tornando mais abundantes no meio. Nesta etapa, não há crescimento da população, onde o número de células que se dividem é igual ao número de células que morrem;
- Fase 7: declínio ou lise. A velocidade de morte é maior que a velocidade de produção de novas células.

Na figura 1 é apresentado o gráfico referente à curva de crescimento microbiano em um processo fermentativo característico.

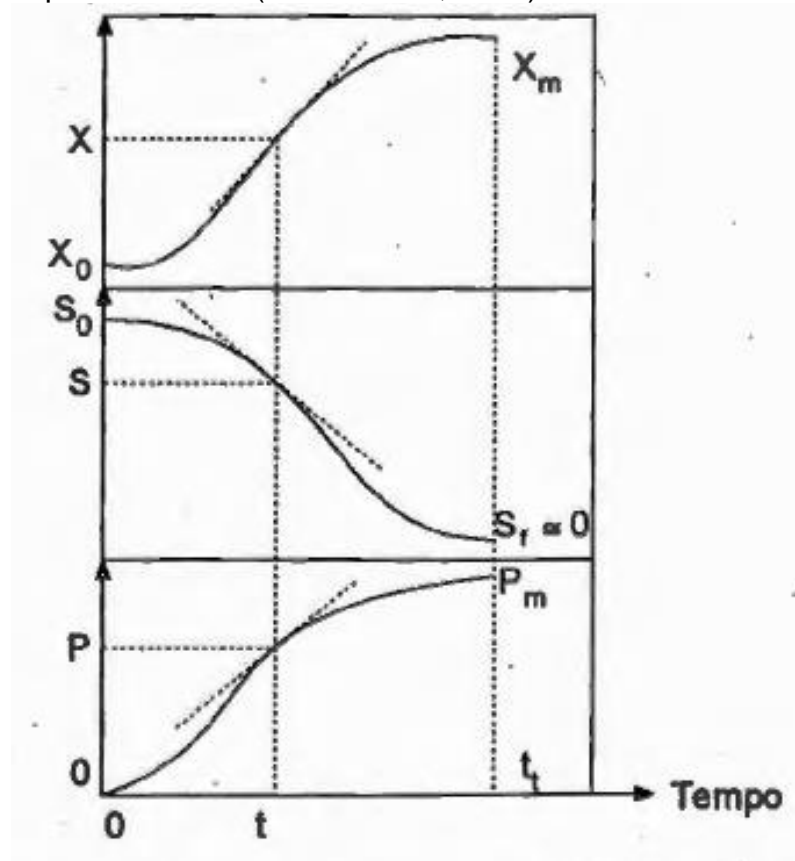
Figura 1. Curva de crescimento microbiano em cultivo descontínuo, representada em ordenadas lineares (A) e semilogarítmica (B). (Fonte: HISS, 2001)



Além da análise da evolução dos valores de concentração da biomassa microbiana, tem-se a mudança nas concentrações de outros componentes importantes do processo fermentativo, como os nutrientes do meio de cultura, o substrato (S), e os produtos oriundos da fermentação, os metabólitos principais (P). Todos esses componentes do sistema são avaliados tendo como parâmetro o tempo de cultivo (HISS, 2001).

Como apresentado na figura 1, conforme ocorre o aumento da biomassa microbiana (X), o substrato tende a diminuir sua concentração (S), devido ao consumo e metabolismo dos microrganismos. Ainda, em processos fermentativos que visam à obtenção de um produto final, é observado o aumento das concentrações do metabólito de interesse (P) conforme a concentração celular e tempo de fermentação (Figura 2).

Figura 2. Curvas de ajuste de resultados de uma experiência idealizada de fermentação. X, P e S são as concentrações do microrganismos, produto e substrato residual no meio, respectivamente. (Fonte: HISS, 2001).



3.3.1 Velocidades de crescimento

Devido ao fato de que a concentração microbiana X aumenta durante um cultivo fermentativo, é possível quantificar a velocidade específica (μ_x) deste crescimento conforme a equação (1):

$$\mu_x = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \quad (1)$$

Outra definição de velocidade que visa a avaliação do desempenho de um processo fermentativo, é a produtividade em biomassa, expressa na equação 2, mostrando que a produtividade representa a velocidade média de crescimento referente ao tempo final de fermentação, t_f .

$$P_x = \frac{X_m - X_0}{t_f} \quad (2)$$

Além disso, é possível quantificar no cultivo os fatores de conversão. O fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$), descrito por MONOD (1949), está expresso na equação 3.

$$Y_{x/s} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (3)$$

Em que: X é a concentração final de células, X_0 a concentração inicial, S_0 a concentração inicial de substrato e S a concentração final de substrato no final do processo fermentativo. Com o uso desta equação, é possível conhecer quanto de substrato é consumido para alcançar uma concentração celular pontual.

Ainda, é possível caracterizar o crescimento da fase logarítmica da curva de crescimento bacteriano. Esta fase, citada anteriormente, pode ser caracterizada por uma linha de tendência linear em um gráfico semi-logarítmico de $\ln(X)$ versus tempo de fermentação, durante o qual, a velocidade de crescimento específica μ_x , é

constante e máxima, caracterizando a velocidade específica máxima de crescimento celular ($\mu_{\text{máximo}}$) (HISS, 2001).

3.4 Resíduo de cervejaria

3.4.1 Indústria da cerveja

No Brasil, o hábito de tomar cerveja se iniciou com a vinda da família real portuguesa, que no século XIX trouxe a cerveja, iniciando a cultura do consumo desta bebida. Até então, a cerveja consumida no Brasil era importada dos países europeus. Entretanto, em 1888, foi fundada a primeira cervejaria do Brasil, a Manufatura de Cerveja Brahma, e anos depois, em 1891, foi fundada a Companhia Antártica Paulista, criada na cidade de São Paulo (VENTURINI FILHO & CEREDA, 2001). Com isso, foram surgindo novas marcas.

Segundo Associação Brasileira da Indústria da Cerveja (CERVBRASIL, 2014), o Brasil produziu 13,5 bilhões de litros de cerveja em 2013 e ocupa o terceiro lugar no ranking mundial de produção, atrás apenas de China e Estados Unidos. No ano de 2013, as companhias produtoras de cerveja foram responsáveis por 2% do PIB nacional, gerando um faturamento de R\$ 70 bilhões o que ressalta a grande importância da indústria cervejeira para a economia brasileira (BARBOSA, 2016).

A cerveja é composta, tradicionalmente, por água, malte de cevada, lúpulo e levedura. Determinados países do mundo permitem alteração desta formulação clássica, entretanto, outros, mesmo ao passar dos séculos, preservam estes constituintes da bebida, como é o caso da *Lei da Pureza (Reinheitsgebot)*, uma norma (aprovada em 23 de abril de 1516 em Ingolstadt, na Baviera, Alemanha) que instituiu que a cerveja deveria ser fabricada apenas com os seguintes ingredientes: água, cevada (malte), lúpulo e levedura.

Entretanto, independente da nacionalidade da bebida, o componente essencial para a sua formulação final é a levedura. Shotipulka et al. (2005) comentam em seu estudo, que devido ao aumento na produção mundial de cerveja, a levedura residual do processo fermentativo vem sendo descartada, e considerada um resíduo industrial. A levedura residual é, geralmente, direcionada ao uso em ração

animal, depois de sua inativação por calor. Entretanto, este resíduo é rico em vitaminas, sais minerais e proteínas que pode ser utilizado como fonte de nutrientes para obtenção de produtos com maior valor agregado através de processos fermentativos (CHAE et al., 2001).

3.4.2 Levedura

As leveduras empregadas no processo fermentativo de cerveja (Tabela 2) são do gênero *Saccharomyces*, em especial a espécie *S. cerevisiae*. Com o progresso da tecnologia de bebidas, as linhagens de levedura vêm sendo selecionadas segundo características desejáveis ao processo e ao produto. A produtividade e a eficiência de fermentação, a tolerância ao etanol e à temperatura, a resistência às altas concentrações de açúcares, a habilidade de flocular e de produzir ou não certos componentes do aroma das bebidas (*flavour*) e a propriedade de produzir metabólitos, como etanol, são constantes fontes de interesse (Hammond, 1995).

Tabela 2. Taxonomia da levedura

| CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA | |
|---------------------------------|----------------------|
| Reino | Fungi |
| Filo | Ascomycota |
| Classe | Saccharomycetes |
| Ordem | Saccharomycetales |
| Família | Saccharomycetaceae |
| Gênero | <i>Saccharomyces</i> |

Como citado por Chae et al. (2001), a levedura é um microrganismo com elevados níveis de proteína e outros compostos orgânicos e inorgânicos.

3.4.3 Extrato de Levedura

As células de leveduras oriundas de cervejaria possuem cerca de 40 a 60% de proteínas, além de ser uma fonte de nitrogênio barata e geralmente reconhecida como uma fonte segura (Chae et al., 2001).

Para obtenção destes nutrientes, a levedura é submetida a processos diversos a fim de se obter o extrato de levedura. Geralmente, a produção de extrato de levedura envolve a ruptura das células, seguida pela remoção de detritos de células a partir de produtos solúveis por centrifugação ou filtração. O rompimento celular pode ser realizado por meios químicos, tais como hidrólise ácida, alcalina, autólise enzimática ou por plasmólise, onde envolve o aumento na concentração de sais do meio (SHOTIPRULKA et al., 2005).

Sgarbieri et al. (1999), descrevem procedimentos necessários para o fracionamento da biomassa de levedura, após ter sido submetida à autólise, além da caracterização química das principais frações obtidas. Sgarbieri et al. (1999), lista algumas etapas para obtenção deste produto, tais como: i) Recuperação e desamargamento da biomassa; ii) Autólise e fracionamento da biomassa limpa e desamargada; iii) Clarificação e desidratação do extrato de levedura. Nestas três etapas são mencionadas formas de retirada dos produtos adsorvidos na superfície da célula durante o mosto fermentativo (taninos, resinas, etc.), autólise por meio de solução indutora de lise e métodos de purificação e liofilização do extrato obtido.

Ainda, Sgarbiere et al. (1999), avaliaram a composição centesimal do extrato de levedura, dados apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Composição centesimal aproximada do extrato de levedura de resíduo de cervejaria.

| Componente | (%) |
|---------------------------|-------|
| Proteína (N x 5,8) | 61,54 |
| RNA | 6,90 |
| Lipídios | 1,89 |
| Cinzas | 12,50 |
| Fibra total | 2,70 |
| Fibra solúvel | 2,70 |

| | |
|------------------------|-------|
| Fibra insolúvel | 0,00 |
| Não determinado | 19,20 |

Fonte: Sgarbieri et al., (1999).

Em outros estudos, como o realizado por Yamada e colaboradores (2003), foram feitas outras análises centesimais do extrato de levedura, obtendo-se resultados semelhantes aos apresentados nos estudos de Sgarbieri et al. (1999). Devido ao seu alto valor nutritivo, alguns estudos têm sido realizados utilizando a levedura residual da produção de cerveja no cultivo de bactérias. Martins (2008) o uso de levedura residual cervejeira na produção de bioinseticida por *Bacillus sphaericus*. Saksinchai et al. (2001) avaliaram o crescimento e esporulação de *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* em um meio de fermentação no qual foi utilizado um extrato de levedura produzido a partir do resíduo de cervejaria. Saksinchai et al. (2001), apresentou em seu trabalho a análise química do extrato de levedura de cerveja quando comparado ao extrato de levedura comercial, chegando a conclusão que a relação carbono nitrogênio (C:N) é maior no extrato de levedura residual, quando comparado ao comercial, no que se refere a quantidade de carboidratos, entretanto, apresentou menor concentração de nitrogênio total.

Devido à elevada concentração de proteínas, o extrato de levedura se torna uma possível alternativa para obtenção de fontes de nitrogênio para diversas finalidades, como no uso em meios de cultura para microrganismos.

4. METODOLOGIA

4.1 Preparo do resíduo

Os resíduos úmidos da cervejaria foram doados por uma cervejaria artesanal da cidade de João Pessoa, PB. Os experimentos deste trabalho foram realizados no Laboratório de Engenharia de Bioprocessos (LEBp), localizado no Centro de Biotecnologia (CBiotec) da UFPB, em colaboração com o Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) e o Laboratório de Bioengenharia do Centro de Tecnologia (CT) da UFPB.

A fonte de nitrogênio deste resíduo foi obtida a partir do desamargamento e autólise das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (Fermentis®) oriundas da fermentação, obtendo-se o extrato de levedura.

4.1.1 Recuperação e desamargamento da biomassa

A suspensão de células foi submetida a centrifugação de 2500 rpm (1020g, rotor 12436, Centrífuga MPW-350, USA), para recuperação das células (SGARBIERI et al., 1999).

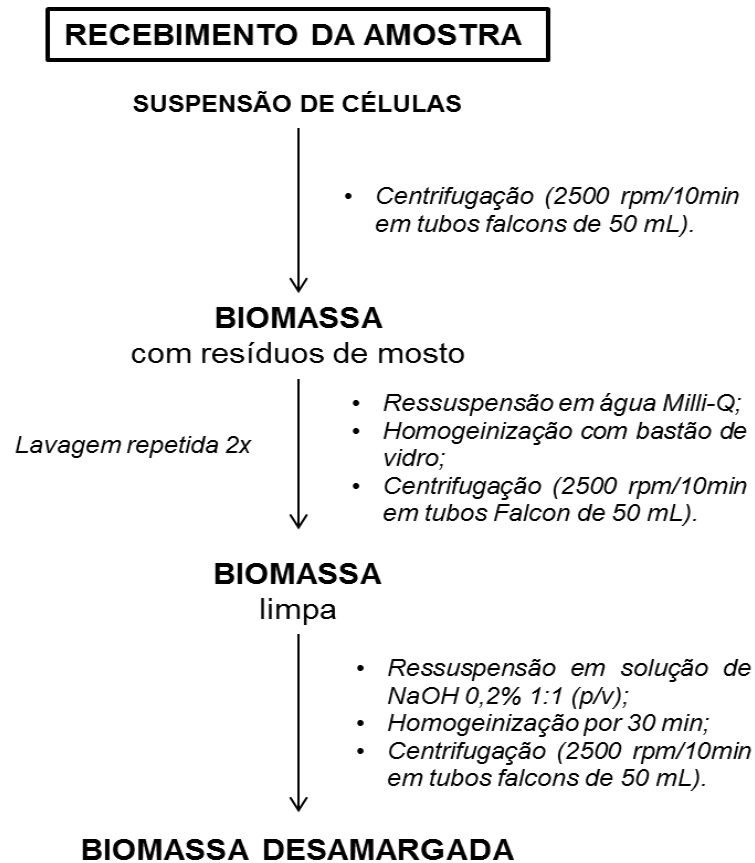
A massa celular obtida (Figura 3), foi submetida a uma série de lavagens e centrifugações (Figura 4), a fim de se obter a biomassa limpa e desamargada (Figura 5). Neste processo, todos os sobrenadantes obtidos dos ciclos de centrifugação foram descartados.

Figura 3. Biomassa centrifugada de levedura residual cervejeira.

Fonte: Autor



Figura 4. Esquema do processo de limpeza (lavagens) e desamargamento de biomassa de levedura (*Sacharomyces cerevisiae*) proveniente de cervejaria artesanal (SGARBIERI et al. 1999, modificado). Fonte: Autor



Como apresentado na Figura 5, após o processo descrito acima, a biomassa desamargada foi transferida a um béquer (500 mL), onde se permitiu a realização da etapa seguinte.

Figura 5. Biomassa desamargada em béquer (500 mL), para realização da autólise.
Fonte: Autor



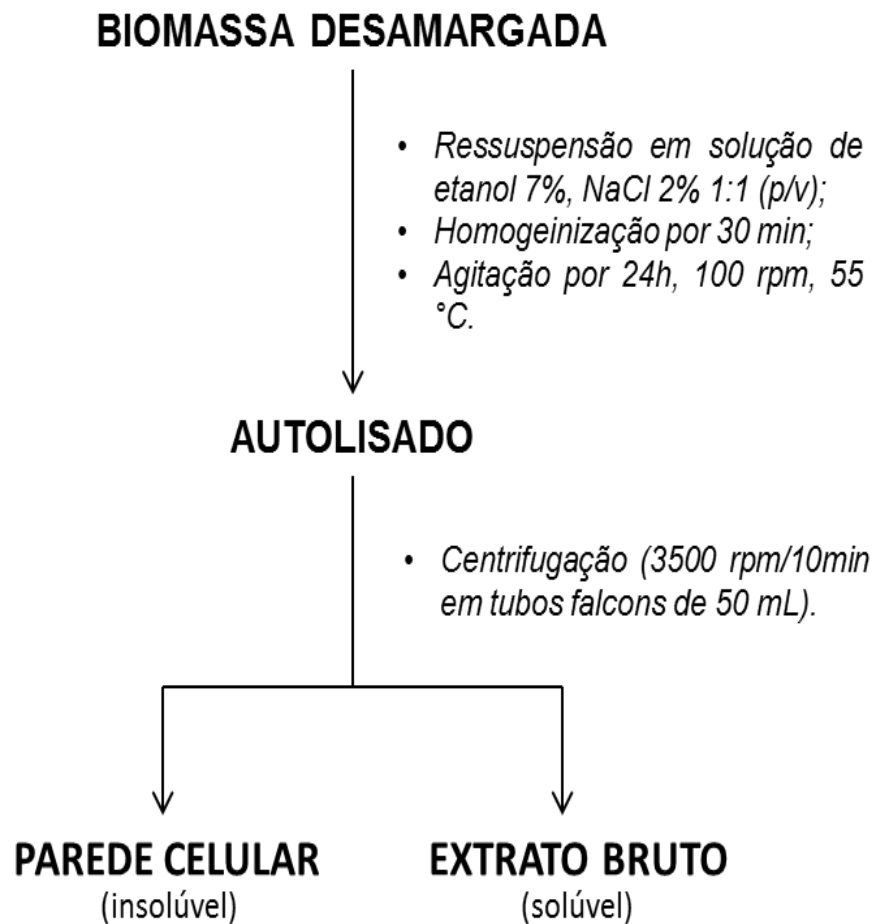
4.1.2 Autólise e fracionamento da biomassa limpa e desamargada

A biomassa limpa desamargada foi ressuspensa em solução de autólise (Figura 6), em Erlenmeyer de 250 mL, sob agitação de 100 rpm a 55 °C por 24 horas (SGABIÈRE et al., 1999, modificado).

Após autólise, a suspensão foi submetida à centrifugação em tubos de centrífuga de 50 mL (Falcon) a 3500rpm por 10 min. Ao final do processo, foi obtida uma fração insolúvel (parede celular) e outra solúvel (extrato bruto da levedura).

A fração solúvel foi utilizada como fonte de nitrogênio em meio de cultura para o desenvolvimento de *Bacillus* sp.

Figura 6. Esquema da autólise da biomassa desamargada (SGARBIERI et al., 1999, modificado). Fonte: Autor



4.1.3 Purificação do extrato bruto solúvel

O extrato bruto, por ter sido submetido à autólise em solução contendo etanol, existe a necessidade da retirada deste álcool da amostra. Para isso, o extrato foi submetido à evaporação do álcool e água em Rota Evaporador (Buchi Labortechnik AG R-II) a 60 °C, 20 rpm, no vácuo por uma hora. Entretanto, este tempo de evaporação pode variar de acordo com o volume a ser evaporado. Após este processo, se obteve o extrato de levedura solúvel (Figura 7).

Figura 7. Extrato de levedura solúvel pós-evaporação em rotaevaporador.
Fonte: Autor



4.1.1 Caracterização do resíduo

A caracterização físico-química dos resíduos quanto ao teor de pH, nitrogênio e proteína total foi realizada com base nas metodologias descritas a seguir.

4.1.1.2 pH

O pH do extrato de levedura de cervejaria artesanal foi quantificado com auxílio de um potenciômetro digital (AKSO – AK 90) previamente calibrado com soluções padrões.

4.1.1.4 Nitrogênio e proteína total

A quantificação de nitrogênio e proteína total foi determinada usando o método de Kjeldahl, realizada no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) do Centro de Tecnologia (CT) da Universidade Federal da Paraíba. Esta metodologia consiste em três etapas: digestão, destilação da amostra e titulação.

4.2 Microrganismo

O microrganismo empregado foi o *Bacillus* sp., linhagem isolada do solo canavieiro, cedido gentilmente pelo Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular da UFPB.

A cultura de *Bacillus* sp. foi mantida em meio sólido ágar Luria-Bertani (Tabela 3) em tubos inclinados com 3 mL de meio (pH 6,8). A renovação das células foi feita periodicamente e realizada por repique em meio e incubadas a 37 °C durante 24 horas. Em seguida, armazenadas a 4 °C para sua conservação.

Tabela 4. Composição do meio Luria-Bertani

| Composição | g/L |
|---------------------|-----|
| Triptona | 10 |
| Extrato de Levedura | 5 |
| Ágar | 20 |

Fonte: *Cold Spring Harbor Protocols* (CSH protocols).

4.2.1 Grupos avaliados

Neste experimento foi avaliada a cinética de crescimento em meio de cultura mineral (Tabela 5), onde diferiram apenas na composição da fonte de nitrogênio e foram separados em grupos: Grupo A, B e C, compostos por extrato de levedura

comercial (1 g/L), extrato levedura cervejeira (1,4 g/L) acrescida com sulfato de amônio (0,5 g/L) e apenas extrato de levedura cervejeira (1,4 g/L), respectivamente.

Tabela 5. Composição meio de cultura mineral.

| Componentes | Concentração (g/L) |
|--------------------------------------------|--------------------|
| Glicose | 20,000 |
| KH₂PO₄ | 3,000 |
| K₂HPO₄ | 7,000 |
| MgSO₄ (7 H₂O) | 0,200 |

4.2.2 Inóculo

A cepa de *Bacillus* sp. foi inicialmente cultivada em frasco erlenmeyers de 125mL contendo 80mL de meio conforme a tabela 6 e o pH ajustado para 6,8.

Todos os inóculos para o cultivo de cada um dos diferentes grupos com suas respectivas fontes de nitrogênio, foram preparados através da transferência, com alça de platina, de colônias isoladas a partir de tubos inclinados com meio sólido ágar Luria-Bertani, e incubados a 37°C sob agitação de 150rpm.

O crescimento bacteriano foi acompanhado pela determinação da densidade óptica do meio de cultivo a 600nm (D.O. 600nm). A suspensão celular foi utilizada quando a D.O. 600nm atingiu absorvância entre 0,6 e 0,8 (DAS & MUKHERJEE, 2007).

Tabela 6. Composição do meio de cultura utilizado no inóculo

| Componentes | Concentração (g/L) |
|--------------------------------------------|--------------------|
| Extrato de levedura comercial | 1,000 |
| Glicose | 20,000 |
| KH₂PO₄ | 3,000 |
| K₂HPO₄ | 7,000 |
| MgSO₄ (7 H₂O) | 0,200 |

4.2.3 pH das amostras

O pH do caldo fermentado foi determinado com auxílio de um potenciômetro digital (AKSO – AK 90) previamente calibrado com soluções padrões.

4.3.4 Quantificação de biomassa

O crescimento microbiano foi acompanhado através do método turbidimétrico a 600nm e gravimétrico por peso seco.

O peso seco consistia em utilizar um microtubo de massa conhecida e adicionar 2 mL de caldo fermentado. O microtubo foi submetido a centrifugação (10000 rpm por 10 minutos). Ao final da centrifugação, o sobrenadante foi descartado. O *pellet* sedimentado foi pesado e levado a estufa (OLIDEF-CZ) a 85 °C por 24h. Em seguida, o *pellet* livre de umidade é pesado. O procedimento foi realizado em triplicata. O peso seco foi determinado de acordo com a equação 4.

$$\text{Peso seco} \left(\frac{g}{mL} \right) = \frac{(\text{massa do microtubo} + \text{pellet livre de umidade}) - \text{massa do microtubo}}{\text{volume da amostra}} \quad (4)$$

4.3.5 Quantificação do substrato

Para determinação dos açúcares redutores utilizou-se o método DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico) descrito por Santos (2007) e que está de acordo com o protocolo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Agroindústria Tropical. Essa metodologia foi, originalmente, proposta por Miller (1959) e baseia-se na redução do ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, em que há a oxidação do grupo aldeído do açúcar a grupo carboxílico. O reagente DNS possui uma cor amarelada, após o aquecimento, torna-se avermelhado de acordo com a concentração de açúcares redutores presente na solução, o que permite sua leitura em espectrofotômetro a 540nm. A curva padrão foi obtida realizando o método DNS, utilizando diferentes

diluições da solução de glicose a 1g/L. Com os valores de absorvância obtidos, foi construída a curva de absorvância versus concentração.

Inicialmente, o caldo fermentado foi submetido a centrifugação a 3600 rpm por 10 minutos. Após este processo, o sobrenadante foi armazenado. Em tubos de ensaio, adicionou-se 0,5 mL deste sobrenadante e 2,5 mL do composto DNS. A amostra foi levada ao banho termostatizado a 100 °C por 10 minutos. Após aquecimento, os tubos são incubados em banho de gelo por 5 minutos. Por último, adiciona-se 3 mL de água destilada a amostra. A análise é realizada em espectrofotômetro (NOVA – ABBE REFRACTOMETER) a 540 nm. A amostra padrão é composta de 0,5 mL de água ao invés do sobrenadante. Cada amostra foi realizada em duplicata.

4.3.6 Determinação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos analisados foram a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máximo}}$), produtividade em células (P_x) e o fator de conversão de substratos em células ($Y_{X/S}$).

A velocidade específica máxima de crescimento (μ_x) foi estimada pelo método de detecção da fase de crescimento exponencial.

A produtividade em células e o fator de conversão de substrato em células foram determinados pelas Equações 05 e 06, respectivamente (SCHMIDELL et al., 2001).

$$P_x = \frac{X_{\text{máx}} - X_0}{t_f} \quad (5)$$

$$Y_{X/S} = \frac{X - X_0}{S_0 - S} \quad (6)$$

Em que:

$X_{\text{máx}}$ – Concentração máxima de células [g.L^{-1}]; X_0 – Concentração inicial de células [g.L^{-1}]; t_f – tempo final de fermentação [h]; $Y_{X/S}$ – Fator de conversão de

substrato em células [$\text{g}_s \cdot \text{g}_x^{-1}$]; S_0 – Concentração inicial de substrato [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]; S – Concentração final de substrato [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$]; P_x – produtividade em células [$\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do resíduo

A caracterização do extrato de levedura oriundo de resíduo de cervejaria quanto ao pH e concentração de nitrogênio e proteínas totais está apresentada na Tabela 7.

Tabela 7. Caracterização do extrato de levedura cervejeira

| Composição | |
|----------------------------------|------|
| Nitrogênio Total | 4,5% |
| Proteína Total (Kjeldahl) | 39% |
| pH | 6,41 |

Fonte: autor

A caracterização do extrato obtido do resíduo de mosto cervejeiro foi necessária para o conhecimento das quantidades de nitrogênio necessárias para a suplementação nutricional suficiente para o desenvolvimento da linhagem de *Bacillus* sp. utilizada neste trabalho. Entretanto, quando comparado com resultados de experimentos de outros autores, como Caballero-Córdobora et al. (1997), Costa et al. (2012), Sgarbieri et al. (1999) e Yamada et al. (2003), foi observado que o percentual de concentração de proteínas neste experimento foi inferior aos citados por esses autores (45%, 51%, 61,54% e 50,7% de proteínas no extrato da levedura, respectivamente). Ainda, quando comparado o percentual de nitrogênio total, foi visto que o extrato de levedura cervejeira deste experimento apresentou valores percentuais inferiores ao das análises de Saksinchai, Supphantharika e Verduyn (2001), no qual o percentual de nitrogênio total foi de 8,2%.

Esses baixos percentuais, tanto de nitrogênio total quanto de proteína total, podem estar associados à forma de obtenção da fonte de nitrogênio. Com exceção de

Sgarbieri et al. (1999) e Costa et al. (2012), as metodologias empregadas pelos demais autores citados foram diferentes a empregada neste trabalho. Caballero-Códobora et al. (2000) e Yamada et al. (2003), utilizaram autólise mecânica com o uso de moinho de bolas, onde este último autor ainda liofilizou o extrato de levedura obtido. Durante a composição centesimal destes extratos, pode ter havido a quantificação de proteínas presentes na membrana e parede celular da levedura, estrutura esta descartada por centrifugação da nossa amostra de extrato de levedura cervejeira.

Ainda, estes baixos percentuais podem estar envolvidos com a diferença de obtenção dessas leveduras residuais. Neste experimento, a levedura residual foi obtida de cervejaria artesanal, possivelmente, a linhagem de levedura utilizada não seja tão otimizada para o processo fermentativo quanto às utilizadas pelos autores citados acima, acarretando nessa diferença de resultados. Outro fator que levado em consideração, é a espécie da levedura utilizada. Caballero-Códobora et al. (2000), Costa et al. (2012) e Sgarbieri et al. (1999) utilizaram *Saccharomyces* sp. Apenas Yamada et al. (2003) utilizou a mesma espécie de levedura deste experimento, *Saccharomyces cerevisiae*. As espécies podem diferir na composição protéica.

Por fim, foi visto que o pH da amostra tendeu a valores não muito abaixo dos ideais para o pH dos meios de cultura utilizados.

5.2 pH das amostras

A variação de pH, apresentada nas Figura 8, 9 e 10, são inerentes aos processos fermentativos dos grupos A, B e C, respectivamente, ao longo de 60 horas de cultivo.

Figura 8. pH referente ao meio de cultura composto com extrato de levedura comercial (Grupo A).

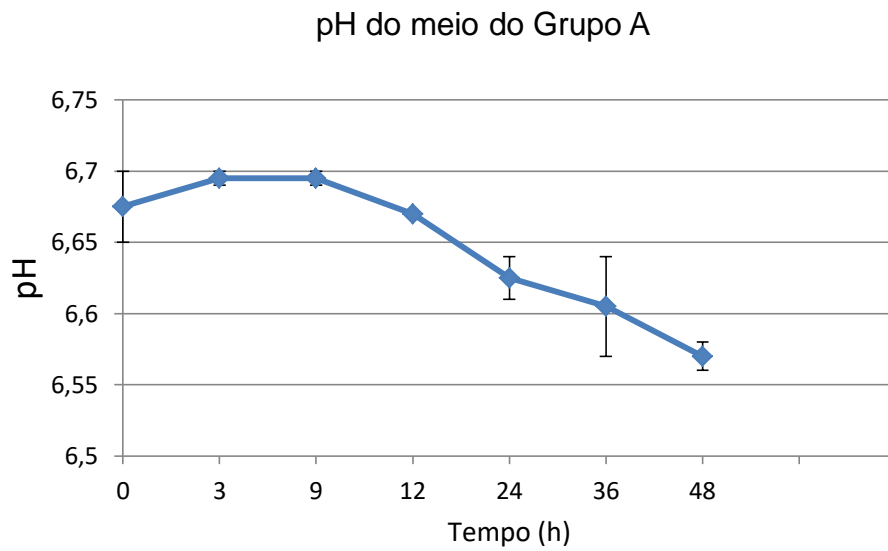


Figura 8. pH referente ao meio de cultura composto com extrato de levedura cervejeira acrescido de amônio (Grupo B).

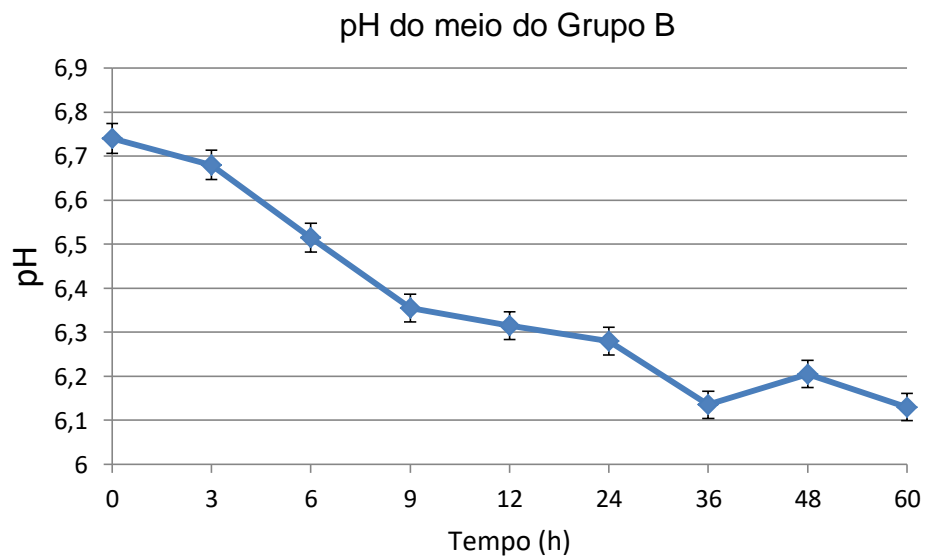
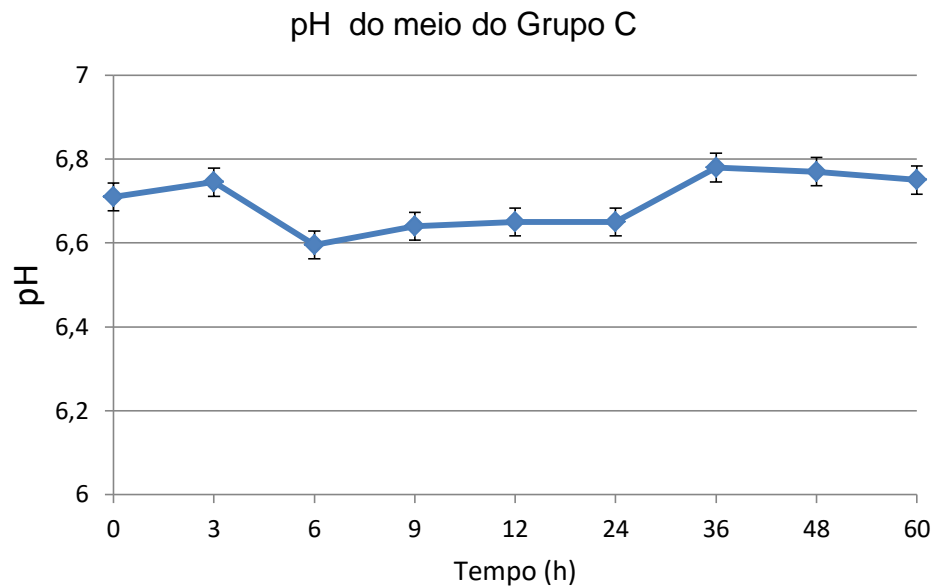


Figura 9. pH referente ao meio de cultura composto com extrato de levedura cervejeira (Grupo C).



Durante o cultivo microbiano, com o passar do tempo de fermentação, são produzidos metabólitos secundários inerentes ao metabolismo celular como alguns ácidos orgânicos, que podem ser o ácido acético, succínico e lático, aumentando a acidez do meio de cultivo conforme se acumulam na suspensão (MOSER, 1996). O único grupo que não apresentou queda dos valores de pH foi o Grupo C.

Possivelmente, o grupo C, por possuir apenas o extrato de levedura cervejeiro como fonte de nitrogênio, não produziu metabólitos ácidos tão quanto os demais grupos. A produção de metabólitos em um processo fermentativo pode variar tanto em função da linhagem utilizada quanto pela composição química do meio de cultura (MARTINS, 2008). Ainda, vale ressaltar a complexidade dos compostos não quantificados presentes na fonte de nitrogênio utilizada no Grupo C, que podem ter atuado de maneira tamponante do meio de cultura, influenciando a manutenção do pH entre 6,6 e 6,8.

5.3 Crescimento bacteriano

O perfil de crescimento microbiano e consumo de substrato está demonstrado das Figuras 11 a 16.

Figura 10. Curva de crescimento do *Bacillus* sp. do cultivo de 48 horas, utilizando como fonte de nitrogênio extrato de levedura comercial comparado ao consumo de substrato (Grupo A).

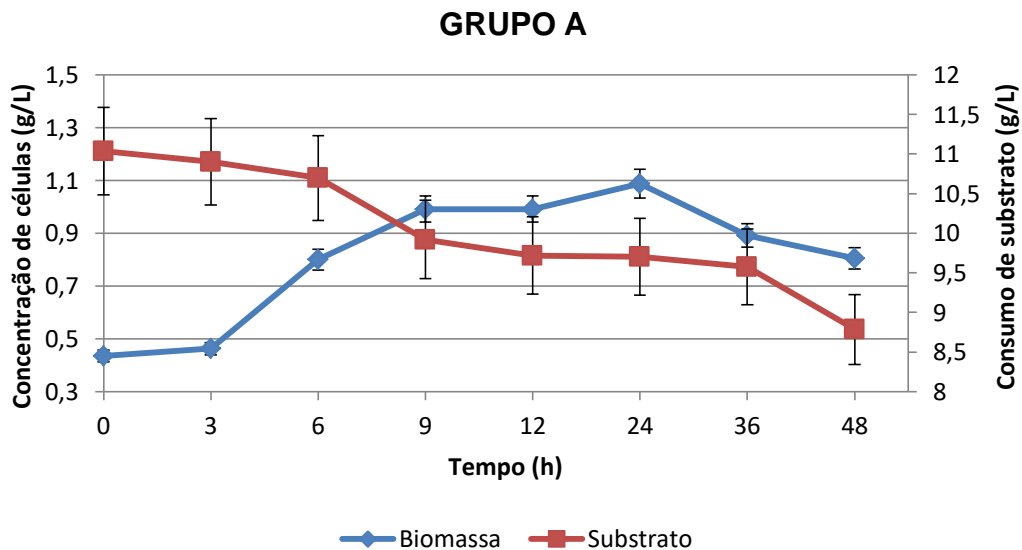


Figura 11. Linha de tendência linear para obtenção do $\mu_{\text{máximo}}$ para o grupo A.

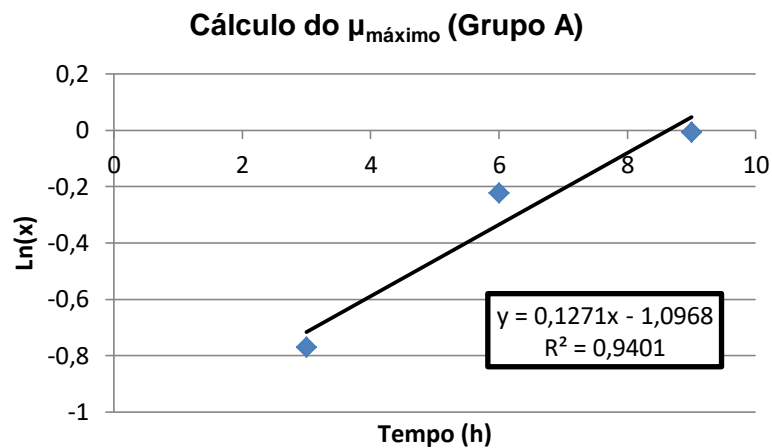


Figura 12. Curva de crescimento do *Bacillus* sp. do cultivo de 60 horas, utilizando como fonte de nitrogênio extrato de levedura cervejeira acrescida de amônio comparado ao consumo de substrato (Grupo B).

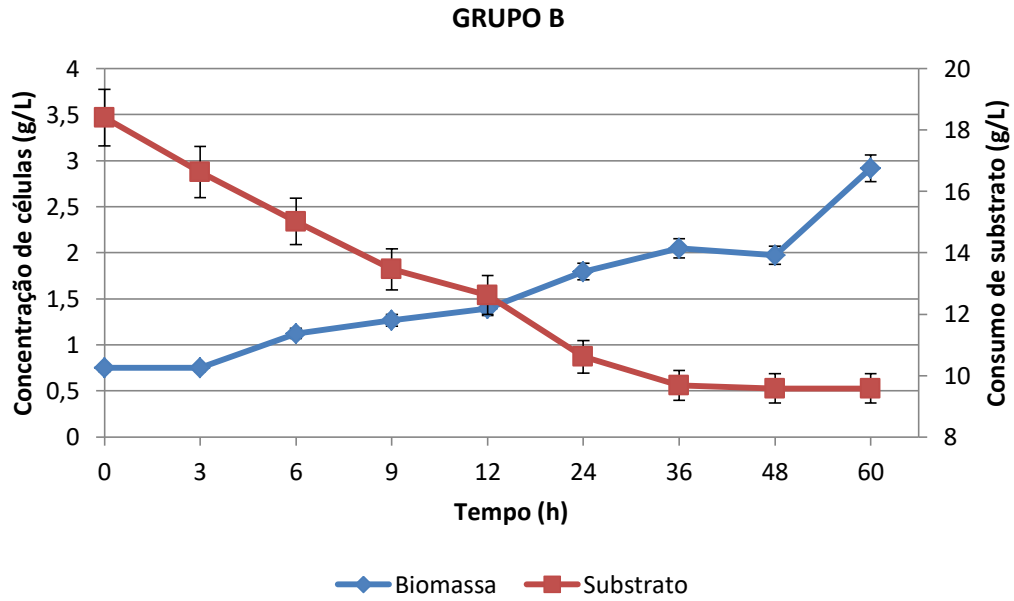


Figura 13. Linha de tendência linear para obtenção do $\mu_{\text{máximo}}$ para o grupo B.

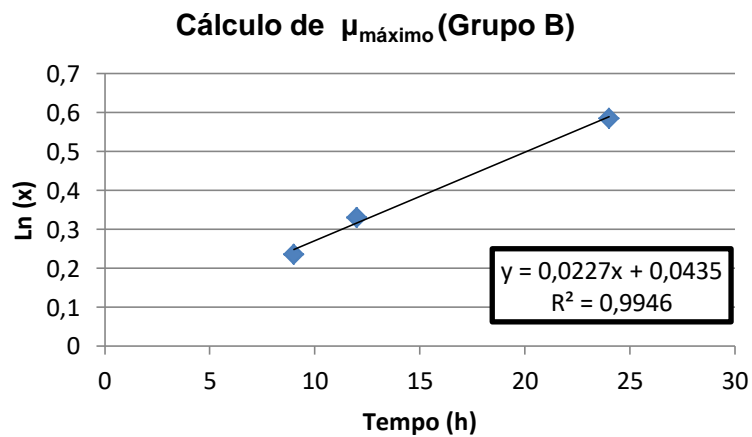


Figura 14. Curva de crescimento do *Bacillus* sp. do cultivo de 60 horas, utilizando como fonte de nitrogênio extrato de levedura cervejeira comparado ao consumo de substrato (Grupo C).

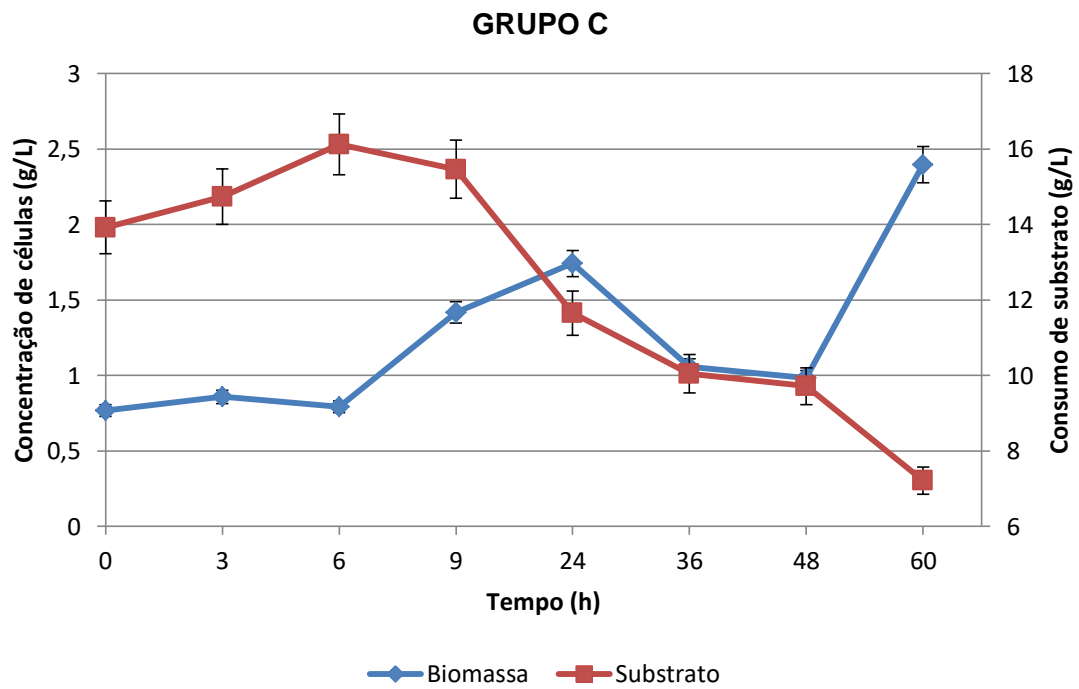
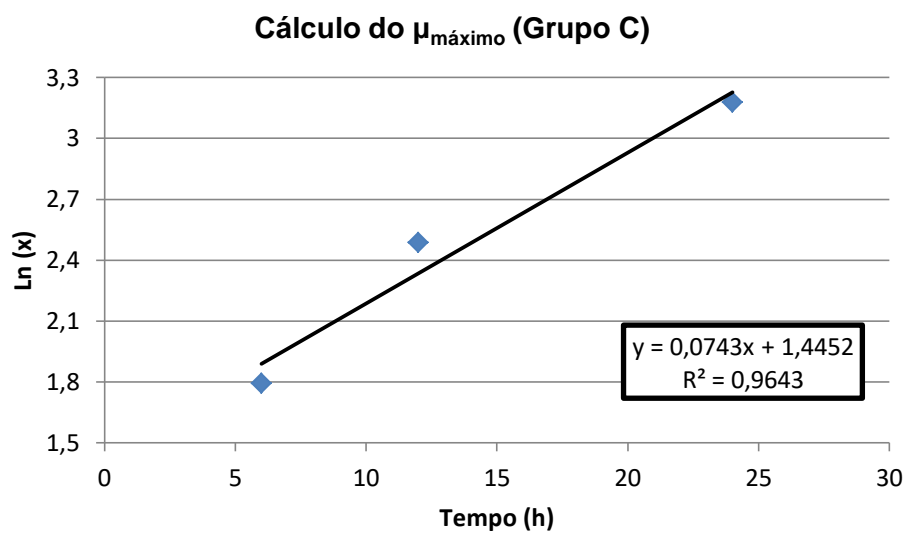


Figura 15. Linha de tendência linear para obtenção do $\mu_{\text{máximo}}$ para o grupo C.



Como apresentado nas figuras anteriores, tanto o grupo B quanto o C mostraram concentração máxima de células no término do cultivo superior ao grupo A. O grupo B apresentou a maior concentração de células de *Bacillus* sp. de aproximadamente 3g/L em 60 horas de cultivo. Entretanto, ao observar os valores do $\mu_{\text{máximo}}$ de cada grupo, é visto que o Grupo A apresentou a maior velocidade específica de crescimento ($\mu_{\text{máximo}} = 0,1271 \text{ h}^{-1}$) em sua fase exponencial, onde o $\mu_x = \mu_{\text{máximo}}$ e constante. Dos grupos suplementados com extrato de levedura cervejeira, o Grupo C foi o que apresentou melhor resultado quanto ao $\mu_{\text{máximo}}$.

Como apresentado na Tabela 9, é possível observar os valores dos fatores de conversão.

Tabela 8. Valores do fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$) e produtividade em células (P_x), para todos os grupos experimentais.

| Parâmetro | Unidade | Grupo A | Grupo B | Grupo C |
|-----------|-------------------|----------|----------|----------|
| $Y_{x/s}$ | g_x/g_s | 0,289408 | 0,252386 | 0,242821 |
| P_x | $g.L^{-1}.h^{-1}$ | 0,013597 | 0,037111 | 0,027153 |

Fonte: autor

Observa-se, ainda, que para cada grama de substrato consumido é formado aproximadamente 0,29 g de massa celular para o Grupo A. Este resultado é o padrão de nossa comparação, visto que este grupo é composto por fonte de nitrogênio comercial, e já utilizado fielmente em vários centros de pesquisa como nutriente para formulação de meio de cultura para microrganismos.

Os dois grupos suplementados com extrato de levedura cervejeira, por mais que os resultados brutos aparentem diferir, estatisticamente eles estão dentro do erro padrão de 5%. Assim, é possível concluir que a conversão de substrato em células dos Grupos B e C, mesmo utilizando uma fonte de nitrogênio residual de cervejaria, não foram interferidas quanto sua produtividade celular, quando comparado ao Grupo A utilizando extrato de levedura comercial.

Em relação à produtividade em células (P_x), foi visto que os Grupos B e C, suplementados com extrato de levedura cervejeira, apresentaram os melhores resultados, onde a cada hora, foi produzido aproximadamente 0,04 g/L e 0,03 g/L de células, respectivamente, durante o processo fermentativo, superando o Grupo A.

Evidenciando, que o resíduo de levedura cervejeira, acrescida ou não por fonte de nitrogênio inorgânico, mostrou-se favorável ao cultivo de *Bacillus* sp. durante fermentação controlada por 60 horas.

Tabuchi (2013) utilizando *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, relata que o maior crescimento celular esteve relacionado quando a relação C:N foi baixa. Nessas condições, o consumo de carbono pela bactéria aumentou. Entretanto, em seus experimentos, foi utilizado glicerol residual da produção de biodiesel, e a concentração de extrato de levedura cervejeira no meio de cultura foi de 30 g/L. Essa justificativa pode estar relacionada ao consumo de substrato pelo Grupo B, onde este apresentou o maior consumo dentre os três grupos estudados, por possivelmente possuir uma fonte de nitrogênio a mais, que não está presente nos demais.

Saksinchai, Suphantharika e Verduyn (2001) em seus experimentos com *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*, observaram que utilizando 2,5% (m/v) de glicose e extrato de levedura cervejeira a 1% (m/v), foi produzida baixa concentração celular, quando comparado com o ensaio utilizando extrato de levedura comercial.

Tabuchi (2013) relata que sua concentração máxima de células apresentou valores menores quando foi utilizado o resíduo industrial de cervejaria (10 g/L), concluindo que para se obter maiores concentrações celulares e maiores produtividades volumétricas, parâmetros importantes na produção industrial, é necessário utilizar o extrato de levedura residual de cervejaria em concentrações superiores a 10 g/L.

6. CONCLUSÃO

A utilização de extrato de levedura residual de cervejaria artesanal como fonte de nitrogênio orgânico no processo de fermentação submersa por *Bacillus* sp. mostrou-se favorável a formação de biomassa bacteriana.

A baixa concentração na composição de nitrogênio total e proteína total no extrato de levedura cervejeira podem estar associadas à fonte de origem da levedura, linhagem e forma de obtenção do extrato.

O fator de conversão de substrato em células mostrou-se favorável ao cultivo, assim como a produtividade em células dos grupos suplementados com extrato de levedura cervejeira.

Para otimização de processos fermentativos utilizando esta fonte de nitrogênio, faz-se necessário o aumento das concentrações desta, diminuindo a relação C:N do meio de cultura utilizado.

Os resultados obtidos, neste trabalho, fornecem dados iniciais para trabalhos futuros, a fim de otimizar este tipo de cultivo.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, R.K.I.; JAYRAMAN, K. Influence of Carbon and Nitrogen Sources on the growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* var *Gallariae* for biopesticide production. Chem. Biochem. Eng., v.17, n.3, p. 225-231, 2003.

ALONSO, F.O.M. Efeito da agitação e aeração na produção de lipases por *Yarrowia lipolytica* (IMUFRJ 50682). Dissertação de mestrado, Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro-RJ, 2001.

BARBOSA, T. M. Desenvolvimento de cerveja artesanal com polpa de maracujá amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa deg*) e avaliação da imobilização de células de *Saccharomyces cerevisiae* no processo de fermentação alcoólica. Monografia de Conclusão de Curso (Universidade de Brasília), 54 f., 2016.

BARRIOS-GONZÁLEZ, J.; TOMASINI, A.; VINIEGRA-GONZÁLEZ, J.; LÓPEZ, J. Penicilin production by solid state fermentation. Biotechnol. Lett., v.10, n.11, p.793-798, 1988.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E. Biotecnologia Industrial, volume 1, Editora Edgard Blucher LTDA, 2008.

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.

BROCHIER, M. A; CARVALHO, S. Efeito de diferentes proporções de resíduo úmido de cervejaria sobre as características da carcaça de cordeiros terminados em confinamento. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.61, n.1, p.190-195, 2009.

CERVBRASIL, Associação Brasileira da Indústria da Cerveja, 2014. Disponível em: <<http://cervbrasil.org.br/arquivos/anuariofinal2014.pdf>>. Acesso em: 28/08/16.

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

COUTO, S.R.; SANROMÁN, M.A. Application of solid-state fermentation to food industry – a review. *Journal of Food Engineering*. 2006.

FALANGHE, H. Produção de microrganismos. In: LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. *Biotecnologia: Tecnologia das fermentações*, v. 1, p-246-245, 1975.

HALASZ, A.; LÁSZTITY, R. Use of yeast biomass in food production. Boca Raton: CRC Press; 1991. 312p.

HAMMOND, J.R.M. Genetically-modified brewing yeasts for the 21st century. Progress to date. *Yeast*, v.11, n.16, p.1613-1627, 1995.

HISS, H. Cinética de processos fermentativos In: SCHMIDELL, W.; LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.R (Coord.) *Biotecnologia Industrial*. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. p.93-122.

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed., Baltimore, Maryland, USA, 1994.

IÇGEN, Y.; IÇGEN, B.; ÖZCENGİZ, G. Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis*: II. Effects of carbon and nitrogen sources, *Res. Microbiol.* V.153, p.605- 609, 2002.

MARTINS, C.D.C. Desenvolvimento de meios de cultivo alternativos para produção de *Bacillus sphaericus* tóxicos contra larvas de *Culex quinquefasciatus* (Diptera:Culicidae). 2008, 129 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Química – UFRJ, Rio de Janeiro, 2008.

MATHIAS, T.R.S.; MELLO, P.P.M.; SERVULO, E.F.C. Caracterização de resíduos cervejeiros. XX COBEQ – Congresso Brasileiro de Engenharia Química, Florianópolis, Santa Catarina, 2014.

MATOS, R. A. G. Produção de cervejas artesanais, avaliação de aceitação e preferência e panorama do mercado. Trabalho de Conclusão de Curso (TCC), Universidade Federal de Santa Catarina, 90 p., 2011.

MEGA, J.F.; NEVES, E.; ANDRADE, C.J. A produção de cerveja no Brasil. Vol. 1, n. 1, 2011.

MONTEIRO, J. B. R., SILVA, D. O., MORAES, C. A. Produção de biomassa protéica de *Trichoderma reesei* e *Rhizopus oligosporus* em bagaço de cana-de-açúcar. *Rev. Microbiol.*, v.22, n.2, p.164-169, 1991.

NOBRE, T.P.; HORII, J.; ALCARDE, A.R. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. *Ciênc. Technol. Aliment. Campinas*, 27(1): 20-25, jan.-mar. 2007.

PINTO, M. H. Produção de biossurfactantes bacteriano e fúngico por fermentação em estado sólido e submersa utilizando resíduos agroindustriais. 2008. 147 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande do Sul, 2008.

PRABAKARAN, G.; HOTI, S.L. Influence of amino nitrogen in the culture medium enhances the production of d - endotoxin and biomass of *Bacillus thuringiensis var. israelensis* for the largescale production of the mosquito control agent. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* v.35, p.961-965, 2008.

SAKSINCHAI, S.; SUPHANTHARIKA, M.; VERDUYN, C. Application of a simple yeast extract from spent brewer's yeast for growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*: a physiological study. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v.17, p. 307-316, 2001.

SANTOS, M. S. dos; RIBEIRO, F. de M. Cervejas e Refrigerantes. São Paulo: CETESB, 2005.

SANTOS, S.F.M. Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato. 2007. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, RN.

SGABIERI, V.S.; ALVIM, I.D.; VILELA, E.S.; BALDINI, V.L.S; BRAGAGNOLO, N. Produção Piloto de Derivados de Levedura (*Saccharomyces* sp.) para Uso como Ingrediente na Formulação de Alimentos. Brazilian Journal of Food Technology, v. 2, n. 1, p.119-125, 1999.

SHOTIPRUK, A.; KITTIANONG, P.; SUPHANTHARIKA, M.; MUANGNAPOH, C. Application of rotary microfiltration in debittering process of spent brewer's yeast. Bioresource Technology, v. 96, p. 1851-1859, 2005.

STEFANELLO, F.S.; FRUET, A.P.B.; SIMEONI, C.P.; CHAVES, B.W.; OLIVEIRA, C.; NORBERG, J.L. Resíduo de cervejaria: Bioatividade dos compostos fenólicos; Aplicabilidade na nutrição animal e em alimentos funcionais. Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental, v. 18, Ed. Especial de Maio, p.01-10, 2014.

TABUCHI, S. C. T. Utilização de extrato de levedo de cerveja como suplemento de meio à base de glicerol residual para produção de bioinseticida por *Bacillus thuringiensis*. 2013. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial na área de Microbiologia Aplicada, Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. Lorena, SP.

VENTURINI FILHO, W. G.; CEREDA, M. P. Cerveja. In: LIMA, U. A. et al. Biotecnologia Industrial: biotecnologia na produção de alimentos. São Paulo: Edgar Blücher, v.4, p. 91-144, 2001.

YAMADA, E. A.; ALVIM, I. D.; SANTUCCI, M. C. C.; SGARBIERI, V. C. Composição centesimal e valor proteico de levedura residual da fermentação etanólica e de seus derivados. *Revista de Nutrição*, v.16, n. 4, p. 423-432, 2003.