

74763 - UTILIZAÇÃO DA LEVEDURA RESIDUAL DE CERVEJARIA COMO FONTE DE NITROGÊNIO PARA CULTIVO DE *BACILLUS* SP.

*Rafael Limongi de Souza*¹, *Kristerson Reinaldo de Luna Freire*² *Andréa Farias de Almeida*³

¹Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - Mestrado, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, Cidade Universitária, CEP: 58051-900, João Pessoa – PB, Brasil.

²Professor Doutor do Departamento de Biologia Celular e Molecular, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, Cidade Universitária, CEP: 58051-900, João Pessoa – PB, Brasil.

³Professora Doutora do Departamento de Biotecnologia, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, Campus I, Cidade Universitária, CEP: 58051-900, João Pessoa – PB, Brasil. E-mail: andreaafalm@cbiotec.ufpb.br.

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 o cultivo de *Bacillus* sp. 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 trabalho, realizou-se o cultivo de *Bacillus* sp com três composições de meio de cultura diferindo na fonte de nitrogênio: Meio A (extrato de levedura comercial), Meio B (extrato de levedura residual cervejeira + amônio) e Meio C (extrato de levedura residual cervejeira). As amostras foram avaliadas quanto o pH, crescimento microbiano e concentração de substrato, bem como, a análise dos seguintes parâmetros cinéticos: $\mu_{\text{máximo}}$, P_x e $Y_{x/s}$. O extrato de levedura residual cervejeira apresentou em sua caracterização 4,5% de nitrogênio total e 39% de proteína total e pH de 6,41. Durante o processo houve diminuição do pH para os cultivos com os Meios A e B. O cultivo com Meio C não houve alteração do pH, mantendo-se entre 6,6 e 6,8. Analisando-se os parâmetros, os cultivos com Meios B e C apresentaram produtividades (P_x) maiores e

fatores de conversão ($Y_{x/s}$) semelhantes ao cultivo com Meio A (controle). Esses resultados evidenciam que o uso do extrato levedura residual cervejeira tem potencialidade como fonte de nitrogênio orgânico para o cultivo submerso de *Bacillus* sp.

Descritores: Fermentação; Resíduo Industrial; Levedo de cerveja; *Bacillus* sp

USE OF RESIDUAL YEAST BREWER AS A SOURCE OF NITROGEN FOR BACILLUS SP. CULTIVATIO

ABSTRACT: Brazil produces about 2.5 million tons / year of wet waste (malt bagasse and residual yeast) from breweries. The residual brewer's yeast has about 70-80% moisture, 45-50% total proteins and 10-20% soluble nitrogen, being a possible source of nitrogen compounds. The objective of this work was to process the residue of brewer's yeast aiming its use as a nutritional source for the cultivation of *Bacillus* sp. The wet brewery residue was recovered, debarked, autolysed, fractionated and its crude extract purified. The residue was characterized for pH, nitrogen composition and total protein. After preparation of the residue, it was added in culture medium. In this work, the culture of *Bacillus* sp was carried out with three compositions of culture medium differing in the nitrogen source: Medium A (commercial yeast extract), Medium B (brewer's residual yeast extract + ammonium) and Medium C (extract of residual brewer's yeast). Samples were evaluated for pH, microbial growth and substrate concentration, as well as the following kinetic parameters: μ_{max} , P_x and $Y_{x/s}$. The extract of residual brewer's yeast presented in its characterization 4.5% of total nitrogen and 39% of total protein and pH of 6.41. During the process there was a decrease in pH for the cultures with Medium A and B. The culture with Medium C did not change pH, remaining between 6.6 and 6.8. Analyzing the parameters, cultures with Mediums B and C presented higher yields (P_x) and conversion factors ($Y_{x/s}$) similar to the medium A (control) culture. These results show that the use of the residual brewer's yeast extract has potential as a source of organic nitrogen for the submerged culture of *Bacillus* sp.

Key-words: Fermentation; Industrial Waste; Brewing yeast; *Bacillus* sp.

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 (1).

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 13 bilhões de litros/ano, perdendo apenas para China, Estados Unidos e Alemanha, sendo responsáveis por 2,1% do PIB (2,3).

A cerveja é composta tradicionalmente por água, malte de cevada, lúpulo e levedura, onde o componente essencial para sua formulação é a levedura (4). O processo industrial de cerveja consiste em três etapas: preparo do mosto, que inclui moagem do malte, mosturação, filtração, fervura, clarificação, processo fermentativo e o acabamento da cerveja, o qual consiste em filtração, carbonatação, modificações no aroma, sabor e cor (5). Ao final do processo, além da cerveja, obtém-se o resíduo cervejeiro, compostos sólidos da matéria prima usada na fermentação e a levedura do mosto (6).

As leveduras empregadas no processo fermentativo cervejeiro, em sua grande maioria, são do gênero *Saccharomyces*, em especial *S. cerevisiae*, que ao longo dos anos teve suas linhagens adaptadas e otimizadas ao processo fermentativo em questão (7). São microrganismos com elevadas concentrações de compostos inorgânicos, orgânicos e proteicos, possuindo cerca de 40-65% de proteínas totais e 10-20% de nitrogênio solúvel (8-10).

O Brasil produz cerca de 2,5 milhões de toneladas/ano de resíduos oriundos de cervejaria, que vem causando danos ambientais significantes ao serem descartados no ambiente (9,11).

Levando em consideração as propriedades nutricionais da levedura residual, pesquisadores (9-11) realizaram procedimentos de obtenção do extrato proteico destes microrganismos, como fonte nutricional na ração animal e na produção de alimentos funcionais para consumo humano (8-11).

O resíduo do setor industrial brasileiro vem ganhando atenção de projetos que envolvam a biotecnologia, e o extrato de levedura residual apresenta potencial

significativo para aplicação nestes processos biotecnológicos (9). Atualmente, pesquisadores buscam utilizar resíduos sólidos e úmidos do processamento de matéria orgânica visando sua utilização como substratos em processos fermentativos, tanto em estado sólido quanto submerso (12).

Os processos fermentativos que utilizam microrganismos podem ter, em sua grande maioria, aplicação de bactérias heterotróficas. Estes microrganismos exigem fontes orgânicas de carbono e nitrogênio para síntese de produtos de interesse industrial, como biossurfactantes, antibióticos e enzimas (13,14). A levedura residual cervejeira tem concentrações significantes de nitrogênio e proteína em sua constituição, sendo estes, substratos limitantes ao crescimento da biomassa bacteriana, além de poder viabilizar os custos da produção de enzimas e outros produtos de alto valor agregado.

Mediante o exposto, este trabalho teve como objetivo processar o resíduo cervejeiro, a fim de obter fonte de nitrogênio alternativa para o cultivo submerso de *Bacillus* sp.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Preparo do resíduo

Os resíduos úmidos da cervejaria foram doados por uma cervejaria artesanal da cidade de João Pessoa, PB. Os experimentos 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 e o Laboratório de Bioengenharia do Centro de Tecnologia (CT) da UFPB.

O extrato de levedura residual foi obtido a partir do processo de desamargamento e autólise das leveduras *Saccharomyces cerevisiae* (Fermentis®) utilizadas na fabricação de cerveja artesanal.

Desamargamento

a) Recuperação e desamargamento da levedura residual

A suspensão de células foi submetida a centrifugação de 2500 rpm (1020 g, rotor 12436, Centrífuga MPW-350, USA), para recuperação da biomassa (10).

A biomassa obtida foi submetida a uma série de lavagens e centrifugações a fim de se obtê-la limpa e desamargada. Neste processo, todos os sobrenadantes obtidos

dos ciclos de centrifugação foram descartados. A biomassa desamargada foi transferida a um béquer (500 mL), onde se permitiu a realização da etapa seguinte.

b) Autólise e fracionamento da biomassa limpa e desamargada

A biomassa limpa desamargada foi ressuspensa em solução de autólise em Erlenmeyer de 250 mL sob agitação de 100 rpm a 55 °C por 24 horas (10, modificado).

Após autólise, a suspensão foi submetida à centrifugação em tubos de centrífuga de 50 mL 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.*

c) Purificação do extrato bruto solúvel

O extrato bruto, por ser 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.

d) Caracterização do resíduo

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

A quantificação de nitrogênio e proteína total foi determinada usando o método de Kjeldahl, realizada no Laboratório de Tecnologia de Alimentos do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba.

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 em tubos inclinados com 3mL de meio (pH 6,8). A renovação das células foi feita periodicamente, realizada por repique em meio e incubadas a 37°C durante 24 horas. Em seguida, armazenadas a 4°C.

Cultivo submerso

Os cultivos do *Bacillus* sp foram realizados utilizando uma composição básica (meio mineral) (Tabela 1) e acrescidos da fonte de nitrogênio (Tabela 2). Meios A, B e C, foram compostos por extrato de levedura comercial (ELC)(1 g/L), extrato levedura residual cervejeira (ELR)(1,4 g/L) acrescida com sulfato de amônio (0,5 g/L) e apenas extrato de levedura cervejeira (ELR) (1,4 g/L), como fontes de nitrogênio, respectivamente.

Tabela 1. Composição meio mineral (MM)

Componentes	Concentração (g/L)
Glicose	20,000
KH ₂ PO ₄	3,000
K ₂ HPO ₄	7,000
MgSO ₄ (7 H ₂ O)	0,200

Tabela 2. Composição do meio de cultura com a fonte de nitrogênio

Meio de cultura	Composição
A	MM +ELC (1 g/L)
B	MM +ELR (1,4 g/L) + (NH ₄) ₂ SO ₄ (0,5g/L)
C	MM +ELR (1,4 g/L)

Inóculo

A cepa de *Bacillus* sp. foi inicialmente cultivada em frasco erlenmeyers de 125mL contendo 80mL de meio conforme a tabela 3 e o pH ajustado para 6,8.

Todos os inóculos para o cultivo de cada um dos diferentes meios 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 inóculo foi acompanhado pela determinação da absorbância do meio de cultivo a 600nm. A suspensão celular foi utilizada quando a D.O. 600nm atingiu absorbância entre 0,6 e 0,8 (15).

Tabela 3. Composição do meio de cultura utilizado apenas no inóculo

Componentes	Concentração (g/L)
Extrato de levedura comercial	1,000
Glicose	20,000
KH ₂ PO ₄	3,000
K ₂ HPO ₄	7,000
MgSO ₄ (7 H ₂ O)	0,200

Análises do processo fermentativo

a) pH das amostras

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

b) Quantificação de biomassa

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

O peso seco consiste 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 1.

$$\text{Peso seco (g/mL)} = \frac{(\text{massa do microtubo} + \text{pellet livre de umidade}) - \text{massa do microtubo}}{\text{volume da amostra}} \quad \text{Eq. (1)}$$

c) Quantificação do substrato

Para determinação dos açúcares redutores utilizou-se o método DNS (ácido 3,5-dinitro salicílico) que está de acordo com o protocolo da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa), Agroindústria Tropical (16).

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 foram incubados em banho de gelo por 5 minutos.

Por último, adicionou-se 3 mL de água destilada a amostra. A análise foi 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 triplicata.

d) Determinação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros cinéticos analisados foram a velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$), produtividade em células (P_x) e o fator de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$).

A velocidade específica máxima de crescimento ($\mu_{\text{máx}}$) 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 02 e 03, respectivamente (17).

$$P_x = \frac{X_{\text{máx}} - X_0}{t_f} \quad \text{Eq. (2)}$$

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

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização do resíduo úmido de cervejaria

A caracterização do extrato de levedura oriundo de resíduo de cervejaria quanto ao pH e concentração de nitrogênio e proteínas totais estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Caracterização do extrato de levedura cervejeira

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

A caracterização do extrato obtido do resíduo de mosto cervejeiro foi necessária para o conhecimento das quantidades 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 (10,18,19,20) foi observado que o percentual de concentração de proteínas neste experimento foi inferior aos já encontrados (45%, 51%, 61,54% e 50,7% de proteínas no extrato da levedura, respectivamente). Ainda, quando comparado o percentual de nitrogênio total (21), foi visto que o extrato de levedura cervejeira deste

experimento apresentou valores percentuais inferiores ao das análises de onde 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. Com exceção de Sgarbieri (10) e Costa (19), as metodologias empregadas pelos demais autores citados foram diferentes a empregada neste trabalho. Alguns utilizaram autólise mecânica com o uso de moinho de bolas e liofilizaram o extrato de levedura obtido (18,20). Ainda, durante a composição centesimal destes extratos (18,20), 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 tenha o seu desenvolvimento otimizado ao processo estabelecido quanto às utilizadas pelos autores citados acima, acarretando a diferença de resultados. Outro fator que deve ser levado em consideração, é a espécie da levedura utilizada. Apenas um dos autores utilizou *S. cerevisiae* (20), onde os demais utilizaram *Saccharomyces* sp. (10,18,19), podendo haver diferença nas concentrações proteicas por características espécie específicas.

Valores de pH das amostras

A variação de pH, apresentada nas Figura 1, dos cultivos com os Meios A, B e C, respectivamente, ao longo de 48 e 60 horas de processo.

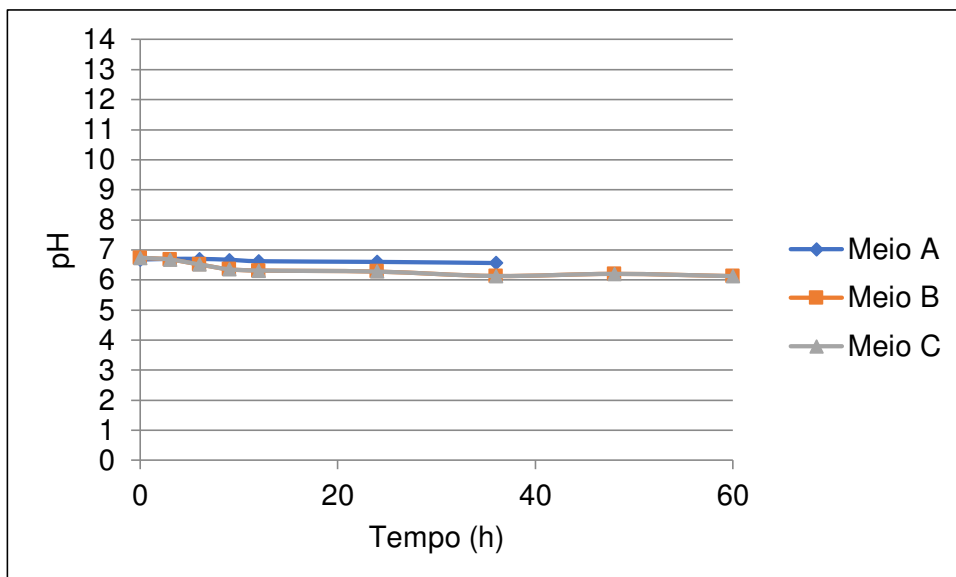


Figura 1. Valores de pH referentes aos cultivos com o Meio A (extrato de levedura comercial), Meio B (extrato de levedura cervejeira acrescido de amônio) e Meio C (extrato de levedura cervejeira).

Durante o processo de fermentação, percebeu-se que não há grandes alterações de pH, mostrando que os meios de cultura utilizados nos experimentos tinham características tamponantes.

Análise da cinética do crescimento do *Bacillus* sp.

O perfil do crescimento bacteriano e consumo de substrato estão demonstrados nas Figuras 2 a 4.

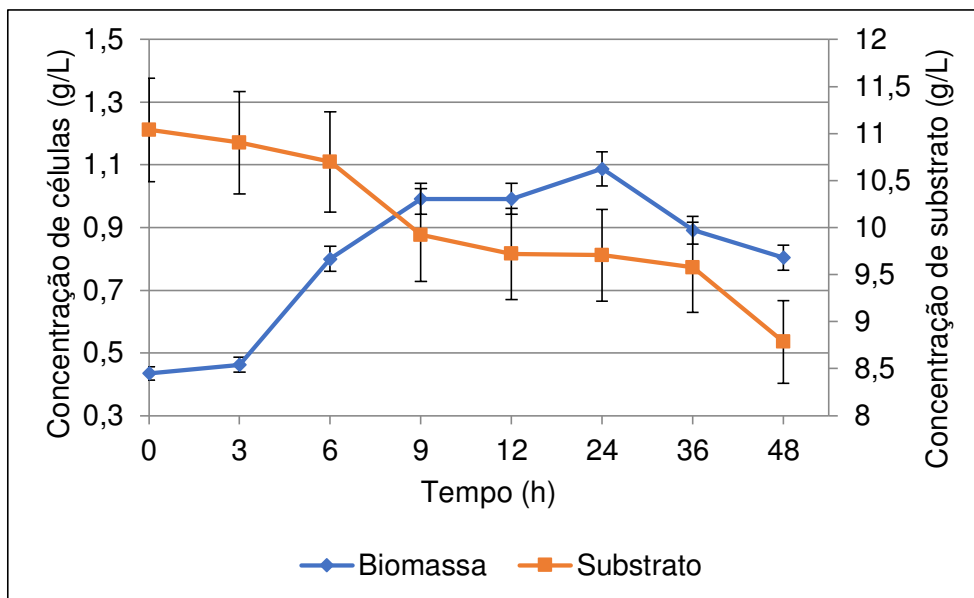


Figura 2. Curva de crescimento do *Bacillus* sp do cultivo de 48 horas, utilizando como fonte de nitrogênio extrato de levedura comercial comparado à concentração de substrato (Meio A).

A partir da curva de crescimento, Figura 2, pode-se estimar a velocidade específica máxima de crescimento do *Bacillus* sp desenvolvido no Meio A. A linearização obtida da fase exponencial, período de 3 a 9 h, observada no crescimento obteve-se o $\mu_{\text{máx}}$ de $0,1271\text{h}^{-1}$, com coeficiente de regressão (R^2) de 0,9401.

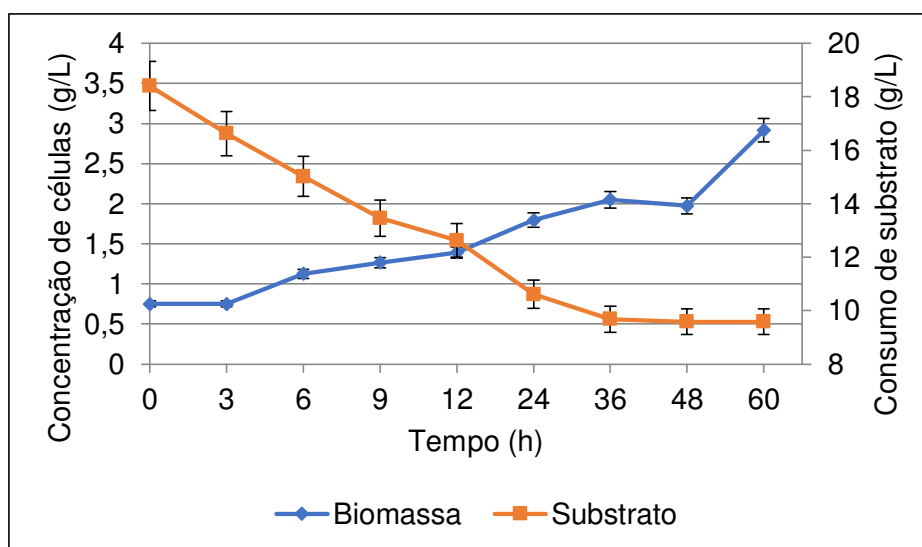


Figura 3. Curva de crescimento do *Bacillus* sp do cultivo de 60 horas, utilizando como fonte de nitrogênio extrato de levedura cervejeira acrescida de amônio comparado à concentração de substrato (Meio B).

A partir da curva de crescimento, Figura 3, pode-se estimar a velocidade específica máxima de crescimento do *Bacillus* sp desenvolvido no Meio B. A linearização obtida da fase exponencial, período de 9 a 36 h, observada no crescimento obteve-se o $\mu_{\text{máx}}$ de $0,0227\text{h}^{-1}$, com coeficiente de regressão (R^2) de 0,9946.

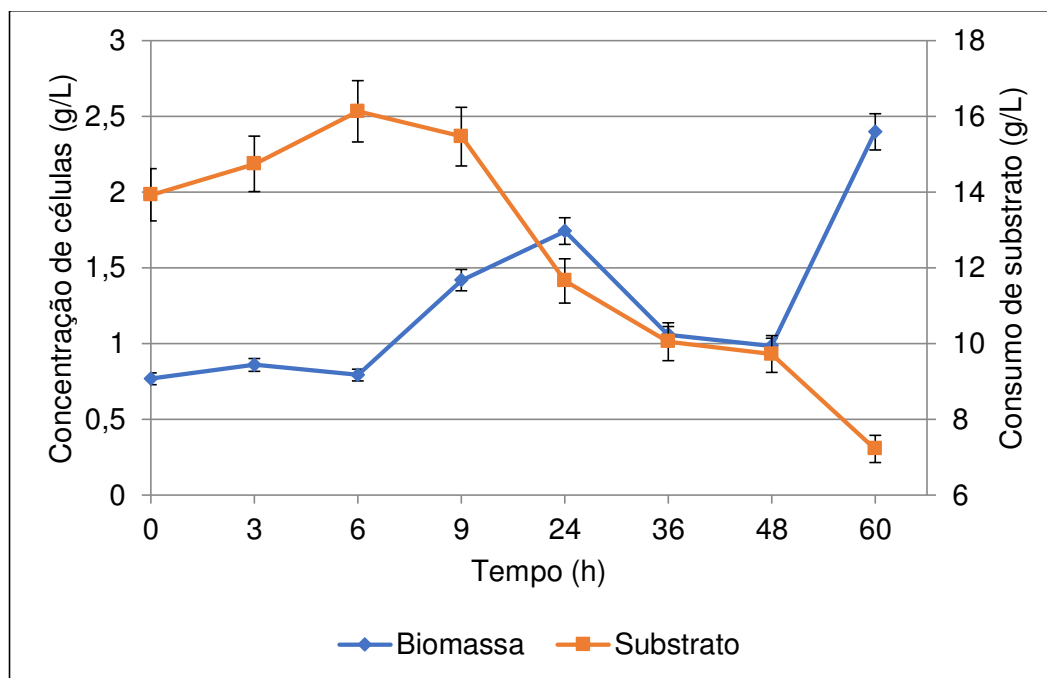


Figura 4. Curva de crescimento do *Bacillus* sp do cultivo de 60 horas, utilizando como fonte de nitrogênio extrato de levedura cervejeira comparado ao consumo de substrato (Meio C).

A partir da curva de crescimento, Figura 4, pode-se estimar a velocidade específica máxima de crescimento do *Bacillus* sp desenvolvido no Meio C. A linearização obtida da fase exponencial, período de 6 a 24 h, observada no crescimento obteve-se o $\mu_{\text{máx}}$ de $0,0743\text{h}^{-1}$, com coeficiente de regressão (R^2) de 0,9643.

Ainda de acordo com as Figuras 2, 3 e 4, tanto o cultivo com Meio B quanto o Meio C mostraram concentração máxima de células superior ao cultivo com Meio A. O cultivo com Meio 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 cultivo, o cultivo com Meio A apresentou a maior velocidade específica de crescimento ($\mu_{\text{máx}} = 0,1271 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$) em sua fase exponencial. Dos cultivos suplementados com extrato de levedura cervejeira, o cultivo com Meio C foi o que apresentou melhor resultado com relação ao $\mu_{\text{máx}}$.

A Tabela 5 mostra os valores dos fatores de conversão e as produtividades obtidos nos experimentos com os diferentes meios de cultivo.

Tabela 5. Fatores de conversão de substrato em células ($Y_{x/s}$) e produtividade em células (P_x) para todos os cultivos.

Parâmetro	Unidade	Meio A	Meio B	Meio C
$Y_{x/s}$	g _x /g _s	0,289	0,252	0,243
P_x	g.L ⁻¹ h ⁻¹	0,0136	0,0371	0,0272

É observado que para cada grama de substrato consumido é formado aproximadamente 0,289 g de massa celular para o cultivo com Meio A. Este resultado foi do cultivo considerado como padrão, pois utilizou-se como fonte de nitrogênio comercial. Os dois cultivos suplementados com extrato de levedura cervejeira, apresentam o erro padrão de 5%, não demonstraram diferenças estatísticas entre os valores. Assim, é possível concluir que a conversão de substrato em células dos cultivos com os Meios B e C, mesmo utilizando uma fonte de nitrogênio residual de cervejaria, não foram influenciadas quanto sua produtividade celular, quando comparado ao cultivo padrão (Meio A), utilizando apenas extrato de levedura comercial como fonte de nitrogênio.

Em relação à produtividade em células (P_x), observou-se que os cultivos com os Meios 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 cultivo padrão (Meio 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 60 horas de processo.

Tabuchi (24) 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 pelo microrganismo 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 cultivo com Meio B, onde este apresentou o maior consumo dentre os três cultivos estudados, por possivelmente favorecido pela concentração de sulfato de amônio acrescido ao meio.

Saksinchai, Suphantharika e Verduyn (21) 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.

4. CONCLUSÕES

A utilização de extrato de levedura residual de cervejaria artesanal como fonte de nitrogênio orgânico no cultivo submerso do *Bacillus* sp. mostrou-se favorável a formação de biomassa microbiana.

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 cultivos suplementados com extrato de levedura cervejeira.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mega JF, Neves E, Andrade CJ. A produção de cerveja no Brasil. Revista Citino. 2011. 1(1): 34-42.
2. CERVBRASIL, Associação Brasileira da Indústria da Cerveja, 2014. Disponível em: <<http://cervbrasil.org.br/arquivos/anuariofinal2014.pdf>> Acesso em: 28/10/17.
3. Barbosa TM. 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 alcohólica. [Monografia]. Brasília: Universidade de Brasília; 2016.
4. Shotipruk A, Kittianong P, Suphantharika M, Muangnapoh C. Application of rotary microfiltration in debittering process of spent brewer's yeast. Bioresource Technology. 2005. (96): 1851-1859.

5. Matos, R. A. G. Produção de cervejas artesanais, avaliação de aceitação e preferência e panorama do mercado. [Monografia]. Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina; 2011.
6. Santos MS, Ribeiro FM. Cervejas e Refrigerantes. São Paulo: CETESB, 2005.
7. Hammond, J.R.M. Genetically-modified brewing yeasts for the 21st century. Progress to date. Yeast. 1995. 11(16): 1613-1627.
8. Chae HJ, Joo H, IN MJ. Utilization of brewer's yeast cells of the production of food-grade yeast extract: effects of different enzymatic treatments on solid and protein recovery and flavor characteristics. Bioresource Technology. 2001. (76): 253-258.
9. Mathias TRS, Mello PPM, Servulo EFC. Caracterização de resíduos cervejeiros. XX COBEQ – Congresso Brasileiro de Engenharia Química: Florianópolis, Santa Catarina; 2014.
10. Sgabieri VS, Alvim ID, Vilela ES, Baldini VLS; Bragagnolo N. Produção Piloto de Derivados de Levedura (*Saccharomyces* sp.) para Uso como Ingrediente na Formulação de Alimentos. Brazilian Journal of Food Technology. 1999. 2(1): 119-125.
11. Stefanello FS, Fruet APB, Simeoni CP, Chaves BW, Oliveira C, Nornberg JL. Resíduo de cervejaria: Bioatividade dos compostos fenólicos; Aplicabilidade na nutrição animal e em alimentos funcionais. Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental. 2014. (18): 01-10.
12. Monteiro JBR, Silva DO, Moraes CA. Produção de biomassa protéica de *Trichoderma reesei* e *Rhizopus oligosporus* em bagaço de cana-de-açúcar. Rev. Microbiol. 1991. 22(2): 164-169.
13. Borzani W, Schmidell W, Lima UA, Aquarone E. Biotecnologia Industrial. Volume 1, 1ª ed. São Paulo: Editora Edgard Blucher LTDA; 2008.
14. Pinto MH. Produção de biossurfactantes bacteriano e fúngico por fermentação em estado sólido e submersa utilizando resíduos agroindustriais. [Dissertação] Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande; 2008.
15. Das K, Mukherjee AK. Comparison of lipopeptide biosurfactants production by *Bacillus subtilis* strains in submerged and solid state fermentation systems using a cheap carbon source in industrial applications of biosurfactants. Process Biochemistry. 2007; 42 (8): 1191-1199.
16. Santos SFM. Estudo da produção de pectinases por fermentação em estado sólido utilizando pedúnculo de caju como substrato. [Tese]. Rio Grande do Norte: Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2007.

17. Hiss H. Cinética de processos fermentativos In: Schmidell, W.; Lima, U.A.; Aquarone, E.; Borzani, W.R, editores. Biotecnologia Industrial. São Paulo: Edgard Blücher; 2001. p. 93-122.
18. Caballero-Córdoba GM. Composição química da biomassa de levedura integral (*Saccharomyces* sp.) e determinação do valor nutritivo da proteína em células íntegras ou rompidas mecanicamente. Food Science and Technology. 1997.
19. Costa GC, Magnani M, Castro-Gomez RJH. Obtenção e caracterização de manoproteínas da parede celular de leveduras de descarte em cervejaria. Acta Scientiarum: Biological Science. 2012. 34 (1): 77-84.
20. Yamada EA, Alvim ID, Santucci MCC, Sgarbieri VC. Composição centesimal e valor proteico de levedura residual da fermentação etanólica e de seus derivados. Revista de Nutrição. 2003. 16 (4): 423-432.
21. 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. 2001. (17): 307-316.
22. Moser SA, Bost KL, Domer JE. Cytokine involvement in immunomodulatory activity affected by *Candida albicans*. Infection and Immunity. 1998. 66(4): 1384-1391.
23. Martins CDC. Desenvolvimento de meios de cultivo alternativos para produção de *Bacillus sphaericus* tóxicos contra larvas de *Culex quinquefasciatus* (*Diptera culicidae*). [Dissertação] Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2008.
24. Tabuchi SCT. Utilização de extrato de levedo de cerveja como suplemento de meio à base de glicerol residual para produção de bioinseticida por *Bacillus thuringiensis*. [Dissertação] São Paulo: Universidade de São Paulo; 2013.