



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE
JANEIRO
ESCOLA DE QUÍMICA



DESENVOLVIMENTO DE BIOPROCESSOS

APLICABILIDADE DE REJEITO DA INDÚSTRIA CERVEJEIRA NA OBTENÇÃO DE BIOPRODUTOS

Bruno da Silva Machado
Renato Pereira de Melo
Roberta Machado Salles Lazzoli

Orientadores: Prof.^a Eliana Flavia Camporese Sérvulo, D. Sc.
Prof^a Alane Vermelho, D. Sc.

Agosto/2007

APLICABILIDADE DE REJEITO DA INDÚSTRIA CERVEJEIRA NA OBTENÇÃO DE BIOPRODUTOS

Bruno da Silva Machado,

Renato Pereira de Melo & Roberta Machado Salles Lazzoli

Desenvolvimento de Bioprocessos submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Químico Industrial.

Aprovado por:

Prof.^a Juacyara Carbonelli Campos, D. Sc.

Prof. Sandro José Baptista, D. Sc.

Prof; Aike Costa da Silva, M. Sc.

Orientado por:

Prof.^a Eliana Flavia Camporese Sérvulo, D. Sc.

Prof.^a Alane Vermelho, D. Sc.

**Rio de Janeiro, RJ - Brasil
Agosto de 2007**

Ficha Catalográfica

Sobrenome, Nome

Aplicabilidade de Rejeito da Industria Cervejeira na Obtenção de
Bioprodutos / Renato Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2007.

romanos, ???p.; il.

Projeto Final – Universidade Federal do Rio de Janeiro,

Escola de Química, 2007.

Orientador(es): Prof^a Eliana Flávia Camporese Sérvulo e Prof^a Alane
Vermelho.

1. Protease. 2. Biosurfactante. 3. Bioprodutos. 4. Rejeito industrial
5. *Bacillus subtilis*

6. Projeto Final UFRJ/EQ). 7. Eliana Flávia Camporese Sérvulo e Alane
Vermelho.

I. Título.

Resumo do Desenvolvimento de Bioprocessos apresentado à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Químico Industrial.

APLICABILIDADE DE REJEITO DA INDÚSTRIA CERVEJEIRA NA OBTENÇÃO DE BIOPRODUTOS

Bruno da Silva Machado
Renato Pereira de Melo
Roberta Machado Salles Lazzoli

Agosto de 2007

Orientadoras: Prof.^a Eliana Flavia Camporese Sérvulo, D. Sc.
Prof.^a Alane Vermelho, D. Sc.

O objetivo do presente estudo é avaliar o uso de rejeito da indústria cervejeira – levedura residual (LRC) - gerado em grande quantidade, na produção de bioprodutos de interesse comercial – biossurfactante e protease - por linhagem de *Bacillus subtilis* isolada de solo contaminado de petróleo, coletado em refinaria. Calcula-se uma disponibilidade de levedura residual de aproximadamente 2 milhões de toneladas/ano no Brasil. Foram avaliadas as concentrações de levedura residual de cervejaria (X_1), açúcar cristal (X_2) e nitrato de sódio (X_3), através de planejamento experimental fatorial 2^3 . Os níveis mínimos das variáveis X_2 e X_3 foram zero a fim de determinar se o rejeito da cervejaria apresentava a capacidade de sustentar a atividade metabólica da linhagem bacteriana e, ainda, estimular a produção de protease e/ou surfactante. O percentual de redução da tensão superficial foi adotado como variável resposta, considerando que este parâmetro é um indicativo da produção de surfactante. A análise estatística dos dados foi feita utilizando-se o programa Statistica 5.0 da StatSoft. Em todas as condições nutricionais testadas, os percentuais de consumo de proteínas foram superiores a 80%, indicando um acentuado consumo de substrato em virtude da ação das proteases sintetizadas pela linhagem bacteriana. Nos meios com 30 g/L de LRC, o consumo de proteínas foi ligeiramente incrementado pela adição de nitrato ou açúcar cristal, mas a adição simultânea de ambos propiciou o máximo de consumo. Na maior quantidade de resíduo (60 g/L), a adição de nitrato e açúcar cristal, isolada ou em conjunto, teve um efeito inverso. Nas condições testadas, a adição de nitrato de sódio, e principalmente de açúcar cristal, foram favoráveis à síntese de biossurfactante. Na menor concentração de LRC e alta concentração de açúcar cristal e nitrato foram obtidas as maiores reduções da tensão superficial. A síntese de proteases foi intensificada pela adição de nitrato. Os resultados obtidos permitem sugerir que a biomassa residual de cervejaria pode ser empregada tanto para a produção de proteases quanto de biossurfactante. Mas, desde que em produções diferenciadas, visto que não há interação entre a síntese de proteases e a produção de surfactantes pela atividade de *Bacillus subtilis* a partir desta matéria-prima protéica. Onde a importância de estudos mais detalhados para o emprego de resíduo de cervejaria para a obtenção de um dos dois bioprodutos.

ÍNDICE

1.INTRODUÇÃO	1
2.OBJETIVO	4
3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
3.1 Agente Biológico	5
3.2 Levedura Residual de Cervejaria	5
3.3 Bioprodutos.....	7
3.3.1. Enzimas.....	7
3.3.2.Biossurfactantes.....	11
4. MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1 Microorganismo	16
4.2 Resíduo Industrial	16
4.3 Meios de Cultura	17
4.3.1. Meio de crescimento.....	17
4.3.2. Meio de produção.....	17
4.3.3. Preparo do inóculo.....	18
4.4 Produção de Biossurfactante e Protease.....	18
4.5. Planejamento Experimental.....	18
4.6. Métodos Analíticos.....	20
4.6.1. Tensão Superficial.....	20
4.6.2. Concentração de Proteína.....	21
4.6.3. Peso Seco.....	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5.1. Produção microbiana de proteases.....	24
5.2. Produção microbiana de biossurfactante.....	29
5.3. Análises Estatísticas.....	31
6. CONCLUSÕES	35
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Tensiômetro Sigma70 System Unit	21
Figura 2 Curva padrão	25
Figura 3 Consumo percentual de proteínas	27
Figura 4 Atividade enzimática	29
Figura 5 Percentuais de redução da tensão superficial	30
Figura 6 Diagrama de Pareto – biossurfactante	32
Figura 7 Gráfico Curva de contorno – biossurfactante	33
Figura 8 Gráfico das Médias Marginais – biossurfactante	33
Figura 9 Diagrama de Pareto – proteases	34

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 Principais grupos de surfactantes de origem animal e sintética...	12
Tabela 2 Principais classes de biossurfactantes e microrganismos envolvidos	13
Tabela 3 Composição básica do resíduo seco	16
Tabela 4 Composição do meio de crescimento	17
Tabela 5 Matriz do planejamento experimental	19
Tabela 6 Valores de Absorvância – BSA	24
Tabela 7 Resultados de proteína no mosto	26
Tabela 8 Atividade enzimática	28

1. INTRODUÇÃO

A Biotecnologia é por definição a aplicação de agentes biológicos, vivos ou mortos, na geração de produtos de valor comercial ou para aplicação em transformações químicas (TREVAN *et al.*, 1990; MADIGAN, 2001). É fato, que os produtos obtidos por via microbiana vêm fazendo parte do cotidiano do Homem há milhares de anos, embora, por muito tempo, a existência de seres microscópicos tenha sido desconhecida. A partir do seu conhecimento, veio o emprego proposital dos microrganismos para a produção de compostos específicos, o que resultou no surgimento de diversificadas indústrias. De modo que, não há exagero ao se afirmar que o desenvolvimento de processos atrelados ao uso de microrganismos mudou o curso da História.

Atualmente, existe uma diversidade de bioprodutos, produzidos por bactérias, fungos e algas, aplicáveis nas mais diferentes áreas. Os produtos microbianos de interesse industrial podem ser de várias naturezas incluindo as próprias células microbianas, ou as substâncias sintetizadas pelas células. Alguns exemplos incluem no âmbito da saúde (antibióticos, vacinas), agricultura (bioinseticidas), indústrias farmacêuticas (vitaminas, enzimas), indústrias alimentícias (aminoácidos, ácidos lático e cítrico), meio ambiente (biomassa, biossurfactantes), compostos de conveniência (etanol, butanol) e, inclusive na recuperação de petróleo (biossurfactantes, biopolímeros), entre outros. Todos os bioprocessos industriais são resultado de otimizações das reações metabólicas realizadas por microrganismos com o único propósito de maximizar o seu rendimento e produtividade, garantindo a comercialização do composto de interesse.

A biotecnologia utiliza matérias-primas renováveis de baixo custo e alta disponibilidade com a finalidade de reduzir os custos do produto final. Os resíduos ou efluentes industriais gerados em grande quantidade são utilizados para produção de

compostos com alto valor agregado, garantindo a viabilidade econômica do processo e reduzindo os impactos ambientais. Neste caso, seriam reduzidos ainda os custos devido aos tratamentos necessários para adequar os rejeitos às normas de descarte segundo a legislação vigente. Portanto, pode-se destacar a biotecnologia como a nova fronteira industrial que possibilita o uso de subprodutos.

A cerveja nacional é produzida por fermentação alcoólica utilizando linhagens de *Saccharomyces uvarum*. Neste processo, ao término da fermentação, as células são reaproveitadas para inoculação de novo mosto. Normalmente, a reutilização das células ocorre por três a cinco ciclos, ou seja, enquanto não houver redução da viabilidade celular em níveis que levem à baixa rentabilidade do processo fermentativo, neste ponto as células são descartadas (PINHEIRO-ROBERG, 2000).

Destaca-se que a cada litro de cerveja produzida, acumulam-se 2,8 L de biomassa. Assim, considerando uma produção industrial média de 700 mil hectolitros mensais, pode-se dimensionar o problema enfrentado pela indústria para descartar esse rejeito segundo as regras estabelecidas pela legislação.

Essa biomassa, rica em nutrientes, pode ser comercializada como ração animal. Para tanto, deveria ser primeiramente concentrada de modo a facilitar seu transporte. Entretanto, o processo para secagem representa um custo adicional. A saber, para evitar qualquer ônus, a companhia cervejeira deveria comercializar o rejeito à pelo menos R\$ 0,50 a tonelada (PINHEIRO-ROBERG, 2000). Por outro lado, nem sempre a procura atende a quantidade de rejeito gerado, o que acarreta em grande acúmulo. Logo, devido ao seu alto valor nutritivo, principalmente em proteínas e vitaminas do complexo B, essa biomassa residual cervejeira é uma matéria-prima adequada para uso em diferentes bioprocessos.

Em geral, o uso de levedura residual cervejeira tem sido testado em conjunto com outras fontes de carbono. No entanto, já foi demonstrada a possibilidade de sua aplicação como única fonte de carbono e energia para produção de bioinseticida de *Bacillus sphaericus* (MARTINS *et al.*, 2006).

Uma outra possibilidade para o emprego deste rejeito de cervejaria, que se apresenta como bastante promissora, é a produção de biossurfactante. Em especial, para aplicação na biorremediação e na recuperação avançada de petróleo, onde o mosto fermentado pode ser aplicado diretamente, ou seja, não haveria a necessidade de realizar processos *downstream*,

o que representa um ônus considerável no valor final do bioproduto. O termo *downstream* refere-se aos processos usados na extração, concentração e purificação de um dado produto.

A produção de enzimas também se apresenta como uma alternativa de interesse devido ao seu alto valor comercial. As proteases estão entre os três maiores grupos de enzimas industriais e correspondem a 60% da venda internacional de enzimas. Estas enzimas estão envolvidas em processos biológicos essenciais, como a coagulação sanguínea, morte celular e diferenciação de tecidos. As proteases podem ser empregadas principalmente na indústria de detergentes e de alimentos, também sendo usadas na indústria farmacêutica. Estas enzimas têm também um papel importante na nutrição uma vez que hidrolisam as proteínas em peptídeos e aminoácidos, facilitando a sua absorção pelo organismo (RAO *et al.*, 1998).

2. OBJETIVO

O objetivo do presente estudo é avaliar o uso de rejeito da indústria cervejeira, gerado em grandes quantidades, na produção de bioprodutos por linhagem de *Bacillus subtilis*.

O objetivo específico foi realizar um estudo de produção de proteases e/ou biossurfactantes utilizando como matéria-prima o rejeito da indústria cervejeira de modo a se obter dados que permitam indicar as condições mais favoráveis para maximizar o rendimento do processo para a produção de ambos os bioprodutos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Agente biológico - *Bacillus subtilis*

O gênero *Bacillus* compreende 34 espécies, sendo o *B. subtilis* considerada a espécie tipo (CLAUS e BERKELEY, 1984). Conforme apresentado por estes autores, as células de *B. subtilis* são Gram-positivas, ocorrendo predominantemente isoladas e raramente em cadeias. São móveis, por meio de flagelos polares e formam endosporos centrais muito resistentes. Macroscopicamente, as colônias apresentam características morfológicas muito variadas principalmente em função da composição do meio de cultura empregado para seu crescimento. Normalmente, as colônias desta espécie apresentam coloração creme ou marrom, são opacas, de forma redonda ou irregular, com superfície rugosa.

Esta bactéria está amplamente distribuída na natureza, pois é aeróbia facultativa, logo apresenta predominantemente metabolismo respiratório, com oxigênio como aceptor final de elétrons. Entretanto, pode crescer anaerobicamente na presença de nitratos. (CLAUS e BERKELEY, 1984). Sendo um microrganismo quimioheterotrófico, cresce em meio mínimo constituído de glicose e sal amoniacal, como únicas fontes de carbono e nitrogênio. Na presença de sacarose, pode formar polissacarídeos extracelulares, como levana e dextrana. Em meios contendo arabinose, xilose e manitol ocorre produção de ácidos. Esta bactéria também é capaz de degradar macromoléculas como amido, pectina e caseína.

B. subtilis apresenta a capacidade de crescer em amplas faixas de temperatura e pH. A faixa de temperatura para crescimento situa-se entre 10 e 50°C, embora temperaturas compreendidas entre 30 e 40°C sejam mais adequadas para seu cultivo. O seu crescimento é mais ativo na faixa de pH de 5,5 a 8,5 (CLAUS & BERKERLEY, 1984).

3.2 Levedura Residual de Cervejaria

A biomassa de levedura (*Saccharomyces* sp.) tem sido produzida no Brasil no setor sucro-alcooleiro, com uma produção anual de cerca de 240 mil ton/ano, como subproduto da produção de etanol (FURCO, 1996); no setor de panificação, com uma produção brasileira de cerca de 120 mil ton/ano (PEIXOTO, 1996); e no setor cervejeiro, contribuindo com cerca de 3500 ton/ano.

Nas cervejarias, ao final do processo de fermentação remove-se a levedura do mosto fermentado e prepara-se com estas uma nova inoculação, para a próxima batelada. No entanto, como durante o processo de fermentação ocorre a multiplicação do levedo, gera-se um excedente deste material a cada batelada, que necessita de um destino adequado. A reutilização das células ocorre no máximo por cinco ciclos, isto é, enquanto não houver redução da viabilidade celular em níveis que levem à baixa rentabilidade do processo fermentativo. Nesta fase, todas as células presentes no reator são descartadas (PINHEIRO-ROBERG, 2000).

As células de levedura apresentam alto teor protéico, entre 30 a 70%, e são ricas em vitaminas, particularmente do complexo B (B₁, B₂, B₆, ácido pantotênico, niacina, ácido fólico e biotina), e em minerais essenciais, macro e microelementos, particularmente selênio e fibra dietética, representados por carboidratos da parede celular, principalmente mananas e glicanas (HALÁSZ, LÁSTITY, 1991). O valor nutritivo das proteínas é considerado bom, correspondendo a 70 - 85% do valor da caseína (CABALLERO-CÓRDOBA *et al.*, 1997). No entanto, apresenta baixos níveis de aminoácidos sulfurados, metionina e cisteína (KINSELLA, SHETTY, 1978, VANANUVAT, 1977, WALSIEN, 1975). Outros problemas restritivos ao uso de leveduras na alimentação humana e de animais monogástricos em geral está relacionado com a rigidez da sua parede celular e ao elevado teor de ácidos nucléicos, particularmente RNA, (WALSIEN *et al.*, 1970, SHETTY e KINSELLA, 1982).

No Brasil, o resíduo cervejeiro é comercializado na forma úmida e, que normalmente é estocado por períodos de 20 a 30 dias. A elevada quantidade de água no resíduo úmido pode resultar em outros fatores limitantes como a dificuldade no transporte a

longas distâncias, dificuldades no armazenamento, ataque de microrganismos, principalmente fungos. Uma das práticas adotadas, na maioria das vezes, é a adição de sal comum (NaCl) na tentativa de minimizar o ataque de microrganismos. Outra possibilidade praticada em muitos países é a desidratação parcial do resíduo que minimiza os problemas de contaminação. Entretanto, o processo para secagem representa um custo adicional.

3.3 Bioprodutos

3.3.1 Enzimas

Enzimas são catalisadores das reações que ocorrem nos sistemas biológicos. Sua eficiência catalítica é extraordinária, muito maior comparativamente á dos catalisadores químicos. As enzimas aumentam as velocidades das reações abaixando a energia de ativação dos sistemas. Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA com propriedades catalíticas, as **ribozimas**, todas as enzimas são proteínas (VOET & VOET, 1995).

Em 1913, Leonor Michaelis e Maud Menten propuseram um modelo simples para explicar as características cinéticas do modelo, no qual E é enzima, S é substrato, ES é o complexo enzima-substrato, P é o produto desta reação.



O complexo ES tem dois caminhos possíveis: ele pode se dissociar em E e S, com uma constante de velocidade k2 ou pode prosseguir para formar o produto P, com uma constante de velocidade k3 (STRYER, 1996). Para as enzimas, a velocidade de catálise V varia com a concentração do substrato S. Com uma concentração fixa de enzima, a velocidade é proporcional a [S], quando a sua concentração é baixa. Em alta concentração

de S, a velocidade é independente da concentração do substrato, e proporcional a concentração do complexo ES.

Classificação das enzimas

A classificação das enzimas consiste na sua organização dentro de grupos com atividades e características catalíticas similares. A nomenclatura das enzimas está de acordo com os princípios, regras e recomendações do Código Internacional, estabelecido em 1961 pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB).

De acordo com a Comissão de Enzimas (E.C.), foi estabelecido que a classificação das enzimas deve ser baseada na sua ação catalítica, possuindo um código numérico formado por um conjunto de quatro (4) números separados por pontos, compreendendo seis (6) classes, a seguir enumeradas:

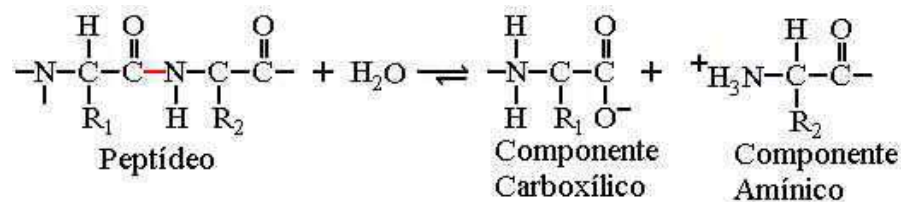
- (I)*Oxidoreductases*: enzimas que catalisam reações envolvendo transferências de elétrons;
- (II)*Transferases*: relacionadas com a transferência de um grupo de um composto para outro;
- (III)*Hidrolases*: relacionadas com a clivagem das ligações químicas por adição de água;
- (IV)*Liases*: enzimas que adicionam grupos a duplas ligações por remoção de grupos;
- (V)*Isomerases*: relacionadas com a transferência de grupos dentro de uma molécula com formação de isômeros;
- (VI)*Ligases*: enzimas envolvidas com a ligação de duas moléculas através de uma reação, as vezes, dependente de ATP como fonte de energia. (VOET & VOET, 1995; LEHNINGER *et al.*, 1996).

Com relação às propriedades das enzimas, pode-se destacar:

- São catalisadores biológicos extremamente eficientes, acelerando as velocidades das reações em 10⁹ a 10¹² vezes, o que representa uma conversão de 100 a 1000 moléculas de substrato em produto por minuto;
- São eficientes mesmo em concentrações muito baixas;
- Atuam em condições ideais de temperatura e pH;
- Possuem todas as características das proteínas;

Enzimas Proteolíticas

Enzimas proteolíticas ou proteases são aquelas que catalisam a quebra das ligações peptídicas em proteínas. Elas pertencem a classe das hidrolases, pois promovem hidrólise das ligações. Apesar de todas terem essa característica funcional comum, elas diferem acentuadamente no seu grau de especificidade (STRYER, 1996). Dentre as hidrolases, as enzimas proteolíticas, peptidases, ou proteases, compreendem 50% das enzimas utilizadas industrialmente. Abaixo é apresentada a reação envolvendo um dipeptídeo, com a sua ligação peptídica mostrada em vermelho, cuja hidrólise ocorre por intermédio de uma enzima proteolítica.



Estas enzimas constituem uma grande família, dividida em:

- Exopeptidases: atuam somente nos finais das cadeias polipeptídicas na região N ou C terminal. Aquelas que atuam na região amino terminal livre liberam um único resíduo de aminoácido (aminopeptidases), dipeptídeo (dipeptidil-peptidases) ou tripeptídeo (tripeptidil-peptidases).

- Endopeptidases: atuam preferencialmente nas regiões internas da cadeia polipeptídica, entre as regiões N e C terminais. A presença de grupos α -amino ou α -carboxila tem um efeito negativo na atividade da enzima.

As enzimas proteolíticas podem ser utilizadas na biotecnologia, como na extração de DNA de células de eucariotos (GEHELHU *et al.*, 1998; CABRAL *et al.*, 2000); na farmacologia, como é o caso da **bromelina**, enzima proteolítica extraída do abacaxi, que possui propriedade antiinflamatória e atividade fibrinolítica; entre outras. (MAURER, 2001).

Proteases Microbianas

Proteases são enzimas que hidrolisam proteínas e catalisam a síntese peptídica em solventes orgânicos ou em solventes com baixa umidade. O uso de proteases em sínteses peptídicas tem inúmeras vantagens em relação ao uso de catalisadores químicos. Este aproveitamento requer o preparo de protease em presença de solventes orgânicos (MEI e JIANG, 2005). Além disso, as proteases possuem aplicação comercial, estando entre os três maiores grupos de enzimas industriais comercializados, correspondendo a mais de 65% da venda internacional. Essas enzimas apresentam uma variedade de aplicações principalmente na indústria de detergentes e de alimentos (BANIK e PRAKASH, 2004).

As proteases microbianas têm sido extensivamente estudadas, havendo necessidade de descobrir novas proteases com diferentes características, para atender o crescimento rápido das indústrias baseadas na tecnologia da produção de enzimas, bem como a otimização dos métodos empregados para a sua purificação (RAZAK *et al.*, 1994).

Essas enzimas são bem distribuídas na natureza, e microrganismos são fontes preferidas dessas enzimas nos bioprocessos de fermentação, porque têm uma taxa de crescimento rápida e também podem ser construídos geneticamente para gerarem novas enzimas com habilidades desejáveis ou simplesmente superprodução de enzimas (NORTH 2001; MALA RAO *et al.* 1998).

A identificação e caracterização de proteases microbianas são importantes para o entendimento dos seus papéis nas infecções de doenças patogênicas como também para

aperfeiçoar suas aplicações na biotecnologia. Com esse propósito, técnicas rápidas e sensíveis para detecção e caracterização de proteases microbianas são altamente desejáveis (LANTZ e CIBOROWSKI, 1994).

3.3.2 Biossurfactantes

Os surfactantes são moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofóbica e uma porção hidrofílica. Em função da presença dessas porções na mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo). A formação de um filme molecular, ordenado nas interfaces, reduz a tensão interfacial e superficial, sendo responsável pelas propriedades únicas dos surfactantes. Estas propriedades fazem os surfactantes serem adequados para uma ampla gama de aplicações industriais envolvendo: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases (DESAI e BANAT, 1997).

Os surfactantes constituem uma classe importante de compostos químicos amplamente utilizados em diversos setores industriais. A produção mundial de surfactantes excede 3 milhões de toneladas por ano, sendo a maioria utilizada como matéria-prima para fabricação de detergentes de uso doméstico. Depois a sua utilização se concentra na indústria de petróleo e na indústria de cosméticos e produtos de higiene (BANAT, 2000).

Atualmente, nos países industrializados 70-75% dos surfactantes consumidos são de origem petroquímica, enquanto que nos países em desenvolvimento os compostos de origem natural predominam. Entretanto, nos países industrializados existe uma tendência para a substituição dos surfactantes sintéticos pelos naturais. Esta tendência é movida pela preocupação ambiental entre os consumidores, combinado com novas legislações de

controle do meio ambiente. Inclui-se ainda a necessidade de produtos mais específicos (BOGNOLO, 1999).

Os compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes, isto é, diminuem a tensão superficial e possuem alta capacidade emulsificante, são denominados biosurfactantes e consistem em subprodutos metabólicos de bactérias, fungos filamentosos e leveduras. A seguir, os principais aspectos relacionados à estrutura química, origem, propriedades e usos dos biosurfactantes (CAMEOTRA e MAKKAR, 1998).

Classificação e natureza química dos biosurfactantes

Os biosurfactantes constituem uma das principais classes de surfactantes naturais (Tabela 1), sendo classificados de acordo com a sua composição química e sua origem microbiana. As principais classes incluem glicolipídios, lipopeptídios e lipoproteínas, fosfolipídios e ácidos graxos, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (DESAI e DESAI, 1993).

Tabela 1. Principais grupos de surfactantes de origem natural e sintética

Naturais	Sintéticos
Alquil poliglicosídeos	Alcanolaminas
Biossurfactantes	Alquil e aril éter carboxilatos
Amidas de ácidos graxos	Alquil aril sulfatos
Aminas de ácidos graxos	Alquil aril éter sulfatos
Glucamidas	Alquil etoxilados
Lecitinas	Alquil sulfonatos
Derivados de proteínas	Alquil fenol etoxilados
Saponinas	Aminoóxidos
Sorbitol e ésteres de sorbitan	Betáinas
Ésteres de sacarose	Co-polímeros de óxido de etil/propileno
Sulfatos de álcoois graxos naturais	Ácidos graxos etoxilados

Fonte: Desai, J. D.; Desai, A. J. Em *Biosurfactants: production, properties, applications*; Kosaric, N., ed.; Marcel Decker: New York, 1993, cap. 3.

Tabela 2. Principais classes de biossurfactantes e microrganismos envolvidos¹

Tipo de Biossurfactante	Microrganismo
Glicolipídios	
- ramnolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
- soforolipídios	<i>Torulopsis bombicola</i> , <i>T. apicola</i>
- trehalolipídios	<i>Rhodococcus erythropolis</i> , <i>Mycobacterium sp.</i>
Lipopeptídios e lipoproteínas	
- Peptídio-lipídio	<i>Bacillus licheniformis</i>
- Viscosina	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
- Serrawetina	<i>Serratia marcescens</i>
- Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i>
- Subtilisina	<i>Bacillus subtilis</i>
- Gramicidina	<i>Bacillus brevis</i>
- Polimixina	<i>Bacillus polymyxa</i>
Ácidos graxos, lipídios neutros e fosfolipídios	
- Ácidos graxos	<i>Corynebacterium lepus</i>
- Lipídios neutros	<i>Nocardia erythropolis</i>
- Fosfolipídios	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>
Surfactantes poliméricos	
- emulsan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- biodispersan	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- liposan	<i>Candida lipolytica</i>
- carboidrato-lipídio-proteína	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
- manana-lipídio-proteína	<i>Candida tropicalis</i>
Surfactantes particulados	
- vesículas	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>
- células	Várias bactérias

Fonte: Desai, J. D.; Banat, I.M.; *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **1997**, *61*, 47.

Função fisiológica dos biossurfactantes

Embora a exata função fisiológica dos biossurfactantes ainda não tenha sido completamente elucidada, algumas funções têm sido atribuídas:

- emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos ou compostos insolúveis em água, facilitando o crescimento de microrganismos nestes substratos (FRANCY *et al*, 1991);

- transporte de hidrocarbonetos (KAPELLI e FIECHTER, 1977)
- aderência-liberação da célula a superfícies, uma das mais importantes estratégias de sobrevivência dos microrganismos (ROSENBERG e RON, 1999);
- atividade antibiótica (LIN, 1996).

Propriedades dos biossurfactantes

Apesar da diversidade de composição química e propriedades, algumas características são comuns à maioria dos biossurfactantes. Muitas destas características representam vantagens sobre os surfactantes convencionais (BOGNOLO, 1999):

- atividade superficial e interfacial: os biossurfactantes são mais eficientes e mais efetivos do que os surfactantes convencionais (detergentes aniônicos sulfatados), pois produzem menor tensão superficial em menores concentrações de biossurfactante (COOPER e PADDOCK, 1984);

- tolerância à temperatura, pH e força iônica: alguns biossurfactantes apresentam elevada estabilidade térmica e de pH podendo ser utilizados em ambientes com condições mais drásticas;

- biodegradabilidade: ao contrário dos surfactantes químicos, os biossurfactantes são facilmente degradáveis na água e no solo, o que os torna adequados para aplicações como biorremediação e tratamento de resíduos (MULLIGAN e GIBBS, 1993);

- baixa toxicidade: os biossurfactantes têm recebido maior atenção também devido à crescente preocupação da população com os efeitos alérgicos dos produtos artificiais (CAMEOTRA e MAKKAR, 1998); sua baixa toxicidade permite o uso em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos. Os biossurfactantes também apresentam a vantagem de poderem ser sintetizados a partir de substratos renováveis e possuem grande diversidade química, possibilitando aplicações específicas para cada caso particular. Além disto, possuem características estruturais e propriedades físicas distintas, o que os torna

comparáveis ou superiores aos surfactantes sintéticos em termos de eficiência (FLASZ *et al*, 1998).

Aplicações industriais

O maior mercado para os biossurfactantes é a indústria petrolífera, onde são utilizados na produção de petróleo ou incorporados em formulações de óleos lubrificantes. Outras aplicações incluem biorremediação e dispersão no derramamento de óleos, remoção e mobilização de resíduos de óleo em tanques de estocagem, e a recuperação melhorada de petróleo. Porém, atualmente, as aplicações se distribuem entre os mais diversos setores industriais (BOGNOLO, 1999).

Os biossurfactantes aumentam a interação água/ óleo e assim aceleram a degradação de vários óleos por microrganismos, promovendo a biorremediação de águas e solos (BANAT, 1995), visto que, 0,08-0,46 % do total de petróleo produzido é lançado no meio ambiente (BOGNOLO, 1999). A biorremediação pode ser feita utilizando os biossurfactantes diretamente para aumentar a solubilidade de contaminantes hidrofóbicos no solo (LANG e WAGNER, 1993).

Resíduos de petróleo que se depositam no fundo de tanques de estocagem são altamente viscosos e podem se tornar depósitos sólidos que não são removidos através de bombeamento convencional. A remoção requer lavagem com solventes ou limpeza manual, porém são perigosas, demoradas e requerem alto custo. Uma alternativa de limpeza é o uso de biossurfactantes que promovem a redução da viscosidade e a formação de emulsões óleo/ água, facilitando o bombeamento de resíduos e a recuperação do petróleo (BOGNOLO, 1999).

Outros campos de utilização dos biossurfactantes incluem produtos de higiene e cosméticos, mineração, agricultura e as indústrias de papel, têxtil, cerâmica, alimentos e farmacêutica (BANAT *et al*, 2000)

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Microrganismo

A linhagem de *Bacillus subtilis* usada neste estudo foi isolada de solo contaminado de petróleo proveniente de refinaria (REDUC-PETROBRAS-RJ). Esta bactéria Gram-positiva foi identificada pelo Laboratório de Enterobactérias e Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ através de provas bioquímicas clássicas. A manutenção da cultura foi feita através de repiques mensais em agar nutriente mantido a 4°C.

4.2 Resíduo Industrial

Levedura inativa seca de cervejaria foi empregada como matéria-prima para elaboração do meio para a obtenção de bioprodutos pela linhagem de *Bacillus subtilis*. Este resíduo (Lote 2006-092) foi gentilmente cedido pela AmBev (Companhia de Bebidas das Américas) e sua composição é apresentada na Tabela 3.

Tabela 3. Composição básica do resíduo seco (100% *Saccharomyces cerevisiae*)

Constituintes	Concentração (g/kg)
Umidade (máx.)	80
Proteína bruta (min.)	400
Matéria fibrosa (máx.)	30
Matéria mineral (máx.)	80
Aflatoxinas (máx.)	50 ppb

Fonte: AmBev

4.3 Meios de cultura

4.3.1 Meio de crescimento

O meio de cultura utilizado para preparo do inóculo, ou seja, com a finalidade de ativar e propagar as células microbianas, foi o caldo nutriente cuja composição é apresentada na Tabela 4.

Tabela 4. Composição do meio de crescimento

Constituintes	Concentração (g/L)
Extrato de Carne	3,0
Peptona	10,0
NaCl	1,0
Na ₂ HPO ₄	5,0

pH do meio foi ajustado em 7,0 com NaOH 1 M.
Esterilização a 121°C/20 min.

4.3.2 Meio de produção

A definição da composição de meio a base de resíduo cervejeiro para produção de surfactante e protease pela linhagem de *Bacillus subtilis* foi o objeto deste estudo. Os experimentos foram realizados em meios constituídos de biomassa residual cervejeira e/ou açúcar cristal, em diferentes concentrações, conforme planejamento experimental, cujo detalhamento é apresentado adiante (item 4.5.1). Em alguns experimentos foram adicionados 4 g/L de NaNO₃, a fonte de nitrogênio normalmente constituinte de meios formulados para a produção de biossurfactantes por espécies de *Bacillus* (RAMANA *et al.*, 1989; DAVIS, LYNCH & VARLEY, 1999; 2001; REIS *et al.*, 2004). Com base na literatura referida também foram adicionados em g/L: KCl (0,1), KH₂PO₄ (0,5), K₂HPO₄ (1,0), CaCl₂.2H₂O (0,01) e MgSO₄.7H₂O (0,5).

4.3.3 Preparo do inóculo

A ativação do microrganismo foi feita através do repique da cultura estoque para outro tubo contendo agar nutriente inclinado. Após incubação a 30°C por 24 horas, duas alçadas da cultura foram cultivadas em 100 mL do meio de inóculo em frascos Erlenmeyers com capacidade para 500 mL. Os cultivos foram incubados a 30°C, sob agitação de 150 rpm, em agitador rotatório, por 16 horas, quando foi determinado o peso seco das células para inoculação dos meios de produção. Como inóculo foi utilizado volume do cultivo de modo a estabelecer uma concentração celular inicial de aproximadamente 0,1 g/L no meio de produção.

4.4 Produção de Biossurfactante e Protease

Os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyer com capacidade para 500 mL, contendo 150 mL do meio de produção. Após inoculação com volume da suspensão celular (item 4.4) de modo a estabelecer concentração inicial de 0,05 – 0,1 g/L em peso seco de células no meio de produção, os cultivos foram incubados a 30°C sob agitação de 150 rpm. Para tempos de processo de 48 e 120 horas foram feitas as determinações de tensão superficial (Tensiômetro Sigma70 System Unit), em amostras do meio fermentado, previamente centrifugadas 13.000 G por 20 minutos, para remoção das células. Foram realizados, no mínimo, dois ensaios para garantir a confiabilidade dos resultados. Os valores expressos representam a média dos resultados com desvio inferior a 10%.

Periodicamente, a pureza dos cultivos foi verificada através de observações microscópicas de preparações coradas pelo método de Gram.

4.5. Planejamento Experimental

Foi utilizado o planejamento experimental fatorial completo de três variáveis independentes, dois níveis (-1,+1) e um ponto central, totalizando nove experimentos. Neste estudo foram avaliadas como variáveis independentes: as fontes de carbono – levedura residual de cervejaria (X_1) e açúcar cristal (X_2) – e nitrato de sódio (X_3). Os níveis mínimos

e máximos da variável levedura residual cervejeira foram definidos de acordo com o seu conteúdo de carbono protéico, enquanto os níveis máximos das outras duas variáveis estudadas foram estabelecidos a partir de dados levantados por consulta bibliográfica (REIS, 1998; DAVIS, LYNCH & VARLEY, 1999; 2001). Os níveis mínimos das variáveis X_2 e X_3 foram zero posto que se desejava determinar se o resíduo em questão era capaz de sustentar a atividade metabólica da linhagem bacteriana com estímulo a produção de protease e surfactante. A matriz do planejamento experimental fatorial 2^3 , e variáveis independentes e os respectivos níveis avaliados estão na Tabela 5.

Tabela 5: Matriz do planejamento experimental apresentando as variáveis independentes e seus respectivos níveis

Exp.	Resíduo Cervejeiro (g/L)	NaNO ₃ (g/L)	Açúcar Cristal (g/L)
1	30	0	0
2	60	0	0
3	30	4	0
4	30	4	0
5	60	0	20
6	30	0	20
7	60	4	20
8	30	4	20
9	45	2	10

Os níveis das variáveis estudadas foram colocados na forma codificada (adimensionalizada), utilizando as seguintes equações de codificação:

$$\text{Equação geral: } X_n = \frac{2(X - X_0)}{X_{+1} - X_{-1}}$$

Sendo: x - o valor da variável a ser calculado;

X_0 - o valor da variável no ponto central;

X_{+1} - o valor da variável no nível superior;

X_{-1} - o valor da variável no nível inferior.

O percentual de redução da tensão superficial foi adotado como variável resposta, considerando que este parâmetro é um indicativo da produção de composto tensoativo e, pela dificuldade em recuperar o lipopeptídio para sua quantificação. Concomitantemente, foi determinada a concentração de protease nas amostras do sobrenadante do mosto fermentado.

A análise estatística dos dados foi feita utilizando-se o programa Statistica 5.0 da StatSoft, através da análise de regressão múltipla, pelo método dos mínimos quadrados, tendo como fatores os termos isolados, de interação e quadráticos das variáveis estudadas.

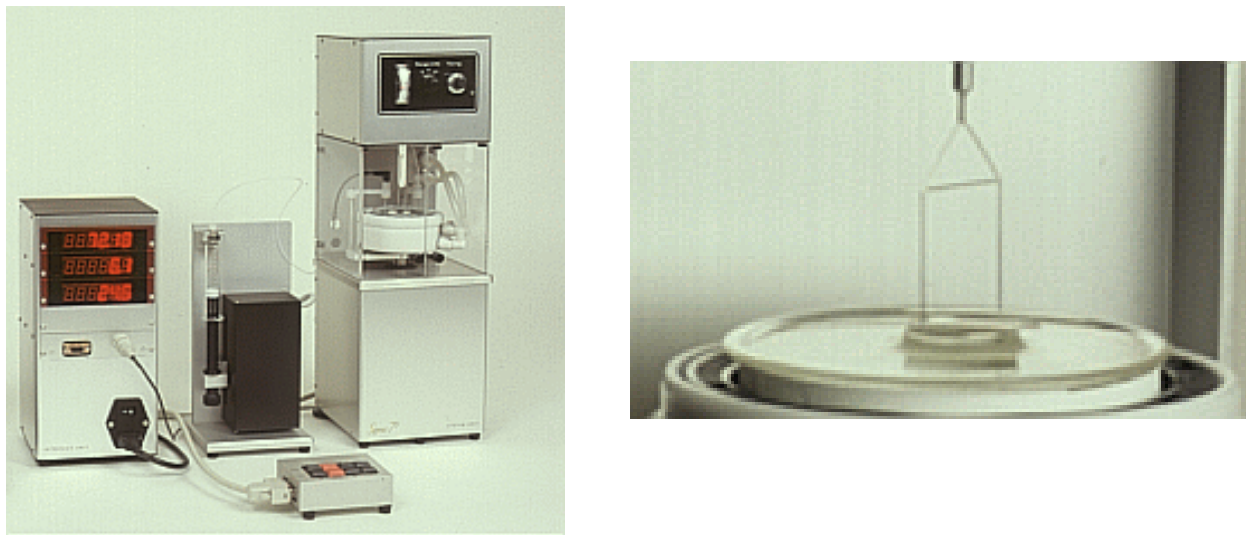
Os resultados dos experimentos foram analisados visando determinar as equações, o R^2 , a curva de resíduos, as variáveis significativas, a intensidade do efeito e do ponto estacionário, isto é, se elas apresentam ponto de máximo, de mínimo ou não apresentam nem ponto de máximo e nem de mínimo (ponto de sela).

4.6 Métodos Analíticos

4.6.1 Tensão superficial

A determinação da tensão superficial foi realizada utilizando o Tensiômetro SIGMA 70 System Unit KSV Instruments Ltd. (Foto 1A). O equipamento é dotado de um anel de platina-iridium (Foto 1B) com 2 cm de diâmetro e 6,4 cm de altura, o qual é imerso no líquido a ser analisado, contido em um recipiente com 5,0 cm de diâmetro. As análises foram realizadas a 20°C.

Figura 1 –Tensiômetro Sigma70 System Unit. com detalhe do anel de platina-iridium.



4.6.2 Concentração de proteína

O substrato foi quantificado enzimaticamente pelo método de Lowry (LOWRY *et al.*, 1951). Este procedimento é um dos mais utilizados para determinação de proteínas. Sob condição alcalina, o cobre complexa com a proteína, que posteriormente se liga ao reagente Folin-fenol adicionado, o que ocasiona a redução do reagente, com a conseqüente mudança de cor de amarelo para azul. A leitura da absorvância é feita em espectrofotômetro num comprimento de onda de 660 nm.

Em microtubos foram adicionadas alíquotas de 50, 100 e 200 µL das amostras a serem analisadas, em duplicata, completando-se em seguida o volume para 500 µL com água destilada. A cada microtubo foram, então, colocados 2,5 mL da solução 1 (vide abaixo). Após repouso por 10 minutos, foram acrescentados 250 µL da solução 2 (vide abaixo), deixando em repouso por 30 minutos. A seguir, foram feitas as leituras de absorvância. A concentração de proteína foi determinada em curva-padrão ($A_{660\text{nm}}$ versus concentração de proteína) construída a partir de concentrações conhecidas de com BSA albumina de soro bovino (BSA).

Reagentes:

- Solução 1 (49 mL de Lowry 1 + 0,5 mL Lowry 2 + 0,5 mL Lowry 3)

Lowry 1 - 2% Na_2CO_3 em NaOH 0.1M.

Lowry 2 - 1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

Lowry 3 - 2% tartarato duplo de Na e K ($\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)

- Solução 2 - reagente de Folin- Ciocalteau 2N, diluído em em água destilada (1:1) no momento de uso.

A partir de solução contendo 0,05mg/mL recém-preparada foram tomadas alíquotas de 5, 10, 50, 100, 200 e 500 μL , com auxílio de micropipetas com graduação ajustável que, a seguir, foram dispostas em microtubos. O procedimento foi realizado em duplicata. Exceto pela alíquota de 500 μL , as demais foram completadas com água destilada de modo a alcançar o volume final de 500 μL . As leituras das absorvâncias foram feitas em espectrofotômetro num comprimento de onda de 660 nm.

A ação das proteases foi quantificada pelo método ELISA. Para tanto, adicionou-se 5 μL da amostra em tubos Eppendorf. A seguir, foram adicionados 256 μL de tampão fosfato (PBS, pH =7,4) e 70 μL do substrato (gelatina 1%). A amostra foi levada à estufa a 37° por 1h; esse tempo é variável de acordo com a amostra.

Ao final de 30 minutos, correspondente ao período de incubação, 100 μL da amostra contida no Eppendorf foram adicionados em poço de placa de fundo chato, onde previamente haviam sido colocados 50 μL de água destilada e 100 μL de comassie G; este reagente tem como finalidade parar a reação. Em seguida, foi lida a absorvância em 595 nm.

Para preparo do branco de reação, foram realizadas as mesmas etapas exceto pela adição do substrato (gelatina). O substrato não deve ser incubado junto com a amostra, apenas colocado logo após a amostra incubada ter sido distribuída no poço.

A partir dos valores de absorvância determinadas para as amostras e respectivos brancos, pode-se calcular a atividade enzimática em unidades/mL, conforme abaixo exemplificado:

$$\frac{1}{x} = \frac{0.01 \text{ a.a}}{(A-B)}$$

Onde: a.a – aumento de absorvância;
x – atividade enzimática (unidades/ml);
(A-B) – diferença entre a amostra e o branco.

4.6.3 Peso seco

A concentração celular dos cultivos utilizados para inoculação dos meios de produção, foi determinada por peso seco. A secagem das células microbianas foi feita em forno de microondas da marca LG, modelo MS-114 ML, conforme procedimento descrito por Reis, Servulo & de França (2004). Com este fim, alíquotas de 5 mL dos cultivos foram filtradas em membranas Millipore de 0,22 µm de diâmetro de poro, previamente pesadas. Em seguida, as células foram submetidas a três lavagens consecutivas, cada uma com 5 mL de água destilada. As membranas com as células foram expostas às microondas, na potência máxima (100%) por 2 minutos. Após resfriamento em dessecador, as membranas foram pesadas em balança analítica ao décimo de miligrama. Os valores referentes ao peso seco das células foram calculados pela diferença entre as pesagens das membranas sem e com células, descontado o valor correspondente à perda de peso das membranas devido à ação das microondas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Produção microbiana de proteases

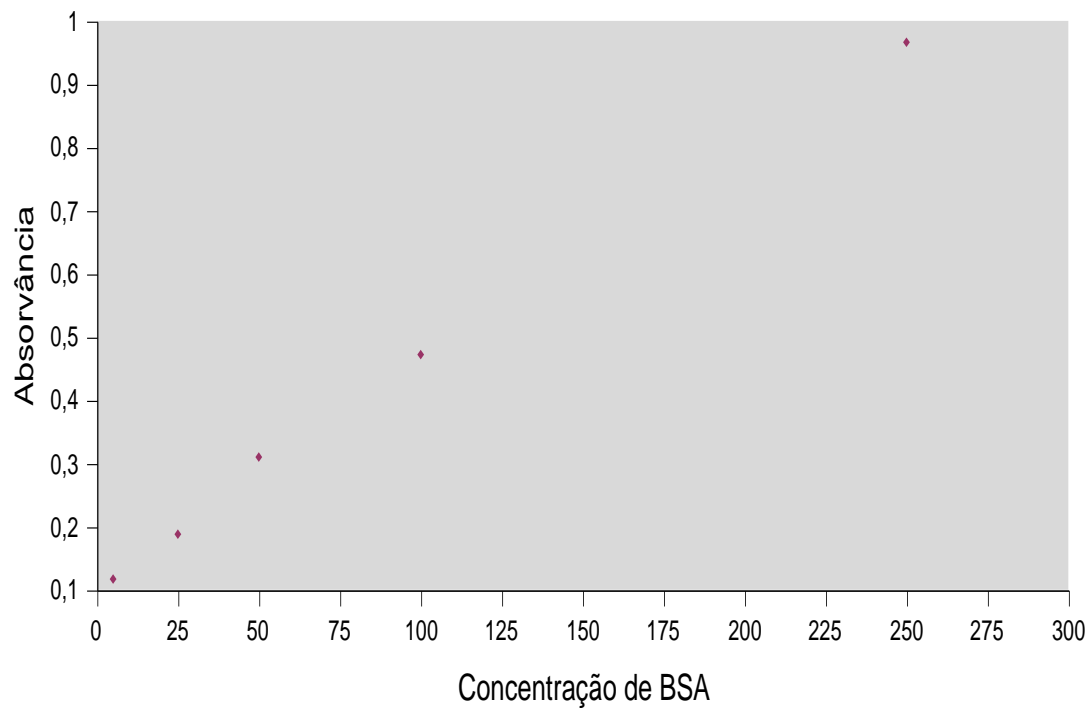
A partir da plotagem dos dados, foi possível obter os valores dos coeficientes linear e angular da reta, definindo a sua equação:

$y = 0.11136 + 0.00346*x$, onde y = absorvância (660 nm) e x = concentração de substrato.

Tabela 6: Valores de Absorvância determinados para diferentes concentrações de albumina de soro bovino (BSA)

BSA (mg/L)	Absorvância (660 nm)
0	0
25	0,2
57	0,31
152	0,64
72	0,36
106	0,48
49	0,28
141	0,6
57	0,31
98	0,45
78	0,38
228	0,9

Figura 2. Curva padrão relacionando concentração de albumina de soro bovino (BSA) e absorvância no comprimento de onda de 660 nm segundo metodologia de Lowry *et al.* (1951).



A partir dos valores encontrados e da equação da curva, pôde-se determinar os valores das concentrações inicial e final de substrato. Esses resultados encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7: Resultados de proteína no mosto antes e após cultivo da linhagem de *Bacillus subtilis*

Exp.	Resíduo Cervejeiro (g/L)	NaNO ₃ (g/L)	Açúcar Cristal (g/L)	Proteína Inicial (g/L)	Proteína Final (g/L)	% Consumo proteico
1	30	0	0	5,7	1	82,5
2	60	0	0	15,3	1,3	91,5
3	30	4	0	7,2	0,6	91,6
4	60	4	0	10,6	1,2	88,7
5	30	0	20	4,9	0,6	87,7
6	60	0	20	10,1	1,5	85,1
7	30	4	20	5,8	0,3	94,8
8	60	4	20	9,8	1,8	81,6
9	45	2	10	7,8	1,4	82,0

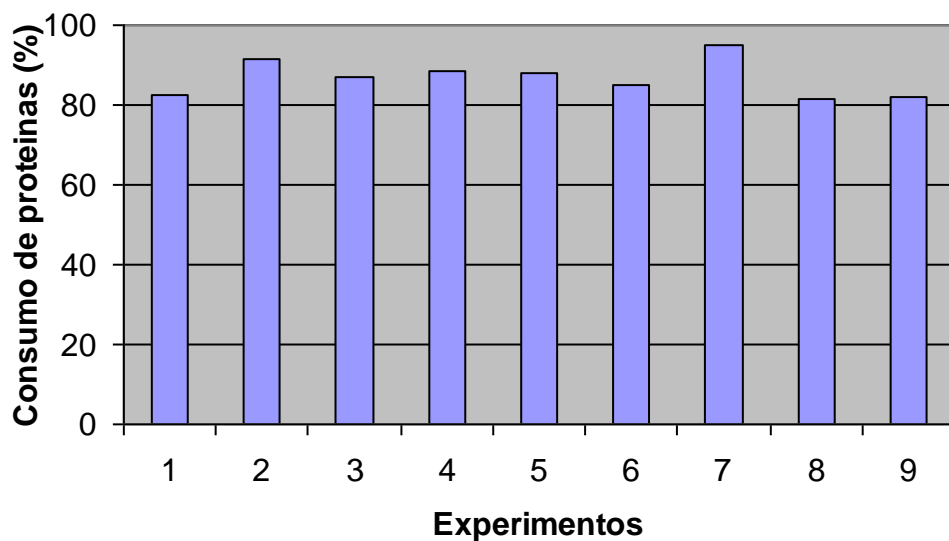
Considerando os resultados da Tabela 7, pode-se observar que nos meios contendo a menor concentração do resíduo (experimentos 1, 3, 5 e 7), o conteúdo protéico inicial expresso em valor médio foi de $5,9 \pm 1,3$. Obviamente, dobrar a quantidade de resíduo no meio provocou o aumento proporcional de proteínas nos meios (experimentos 2, 4, 6, e 8) para $11,5 \pm 1,7$. Ambos os valores estão em conformidade com as quantidades de proteína constituinte do produto comercializado pela empresa adicionadas ao meios.

Na Figura 3 são mostrados os percentuais de consumo de proteínas nas diferentes condições nutricionais testadas. Em todas as condições houve um consumo de proteínas superior a 80%. Logo, ocorreu um acentuado consumo de substrato em virtude da ação das proteases sintetizadas pela linhagem bacteriana.

Nos meios com 30 g/L do resíduo, o consumo de proteínas foi ligeiramente incrementado pela adição de nitrato (experimento 3) ou açúcar cristal (experimento 6), mas a adição simultânea de ambos elevou o consumo de 82,5% (exp. 1 – sem adições) para

94,8% (exp. 7), que foi o valor máximo alcançado. Nos experimentos realizados com a maior quantidade de resíduo – experimentos 2, 4, 6 e 8 – a adição de nitrato e açúcar cristal, isolada ou em conjunto, levaram a efeito inverso; o valor máximo sendo de 91,5% (exp. 2).

Figura 3. Consumo percentual de proteínas em experimentos realizados em meios à base de resíduo da indústria cervejeira em diferentes condições nutricionais.



Na Tabela 8 são mostrados os resultados, bem como os valores calculados referentes à determinação da atividade das proteases sobre gelatina para as diferentes condições de estudo. Pode-se observar a ação das proteases em cada uma das amostras.

Tabela 8: Atividade enzimática das amostras de mosto fermentado sobre gelatina

Exp.	Resíduo Cervejeiro (g/L)	NaNO₃ (g/L)	Açúcar Cristal (g/L)	Amostra (A)	Branco (B)	AE (U/mL)
1	30	0	0	1,395	1,164	1310
2	60	0	0	1,319	1,163	1560
3	30	4	0	1,390	1,164	2260
4	60	4	0	1,455	1,220	2350
5	30	0	20	1,438	1,255	1830
6	60	0	20	1,404	1,243	1610
7	30	4	20	1,147	1,013	1340
8	60	4	20	1,214	1,0588	1560
9	45	2	10	1,462	1,275	1870

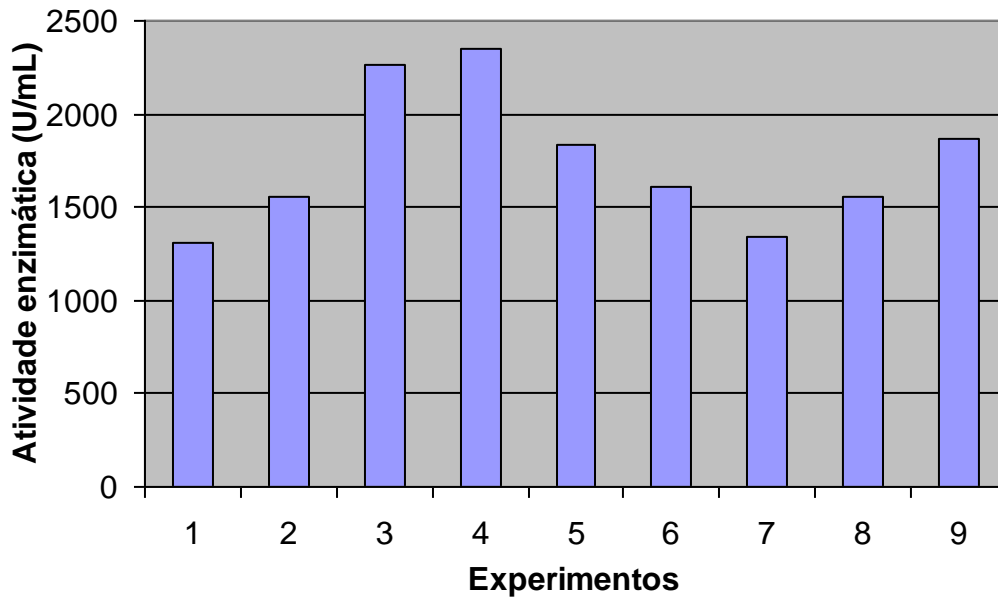
AE: atividade enzimática

Logo, os valores encontrados nos mostram que o resíduo foi capaz de estimular a produção de proteases ativas. No entanto, ao contrário do consumo percentual de proteínas que apresentou ligeira variação (Figura 3), a atividade enzimática variou expressivamente com a condição empregada conforme pode ser observado na Figura 4.

Comparativamente, o aumento da quantidade de proteína inicial no meio (exp. 1 e 2) praticamente não influenciou na síntese de proteases. A adição de açúcar cristal elevou a atividade enzimática em 28% no meio contendo 30 g/L de resíduo cervejeiro, mas seu efeito foi inexpressivo no meio com 60 g/L. Contudo, a adição de nitrato potencializou a síntese de proteína, sobretudo no meio com 30 g/L de resíduo.

A síntese de enzimas não foi relacionada ao consumo de proteína, uma vez que a adição de açúcar cristal e nitrato em conjunto não teve efeito na atividade enzimática.

Figura 4. Atividade enzimática, expressa em unidades/mL, determinada em diferentes condições nutricionais com meios à base de resíduo da indústria cervejeira.



5.2 Produção microbiana de biossurfactante

A síntese de produtos tensoativos pela linhagem de *Bacillus subtilis* foi determinada indiretamente pela redução da tensão superficial, cujos valores obtidos são apresentados na Figura 5.

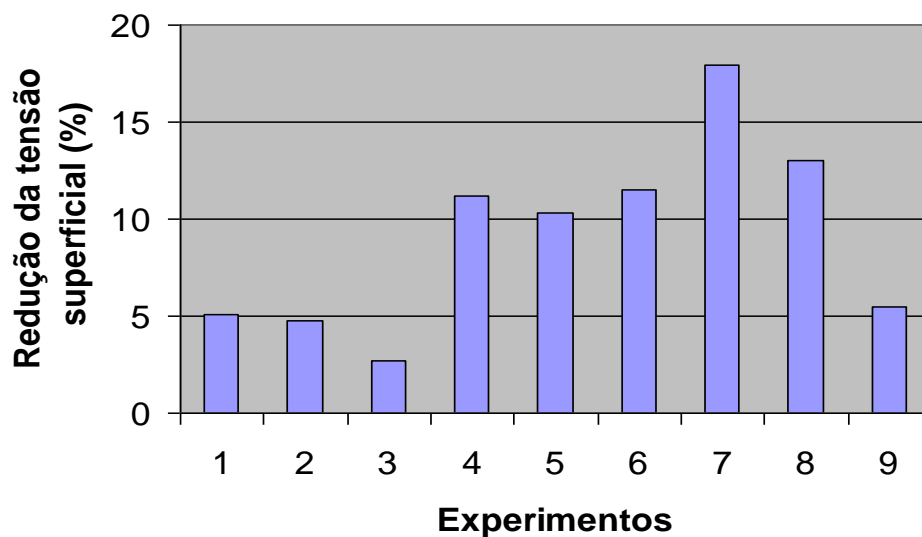
Conforme citado por COOPER (1986), um microrganismo é considerado promissor se produz composto tensoativo capaz de reduzir a tensão superficial a valores inferiores a 40 dina/cm. Neste estudo, os experimentos conduziram a valores de tensão superficial iguais ou menores deste valor.

É notória a variação do percentual de redução da tensão superficial em função da adição de nitrato e/ou açúcar cristal em meios à base de resíduo de cervejaria. Nas condições estudadas, a adição de nitrato de sódio, mas principalmente de açúcar cristal, foi indicada para a síntese de biossurfactante, posto que foi obtida a maior redução percentual.

O máximo de produção de surfactina foi alcançado quando o resíduo na concentração de 30 g/L foi adicionado conjuntamente de nitrato e açúcar cristal.

Os resultados obtidos permitem sugerir que a biomassa residual de cervejaria pode ser empregada tanto para a produção de proteases quanto de biossurfactante. Mas, desde que em produções diferenciadas, visto que não há interação entre a síntese de proteases e a produção de surfactantes pela atividade de *Bacillus subtilis* a partir desta matéria-prima protéica. Donde a importância de estudos mais detalhados para o emprego de resíduo de cervejaria para a obtenção de um dos dois bioprodutos.

Figura 5: Percentuais de redução da tensão superficial determinados para cultivos da linhagem de *Bacillus subtilis* em resíduo de cervejaria sem e com adição de nitrato de sódio e açúcar cristal, em separado ou em conjunto.



5.3 Análises Estatísticas

A otimização do processo visando à produção de biossurfactante e/ou protease foi realizada em relação às variáveis: concentração de resíduo de cervejaria, concentração de nitrato e concentração de açúcar cristal, e pela análise das variáveis resposta: atividade enzimática e redução da tensão superficial.

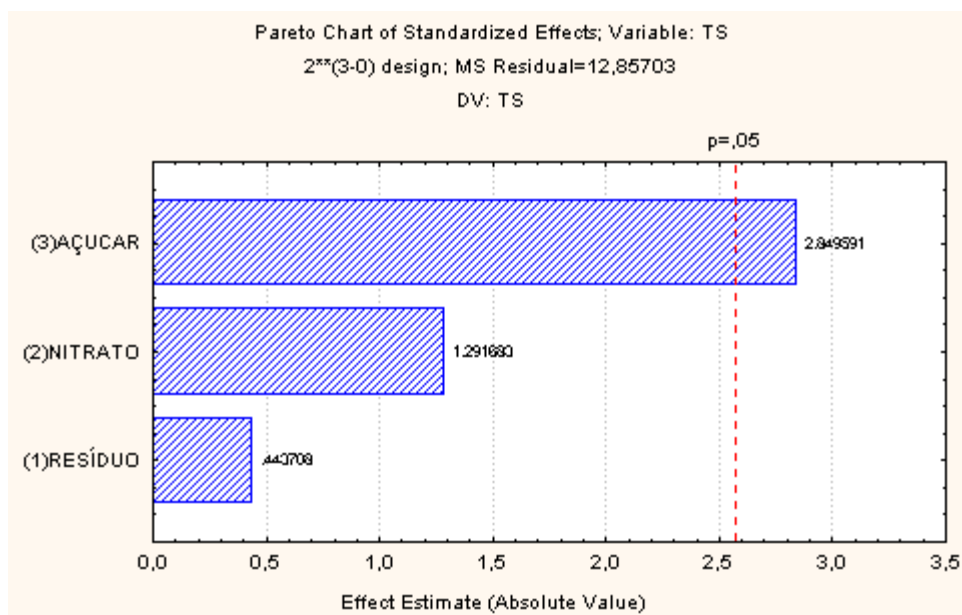
NUMERIC VALUES	1 RESÍDUO	2 NITRATO	3 AÇUCAR	4 TS	5 PROTEASE
1	-1	-1	-1	5,10	1310,00
2	1	-1	-1	4,80	1560,00
3	-1	1	-1	2,70	2260,00
4	1	1	-1	11,20	2350,00
5	-1	-1	1	10,30	1830,00
6	1	-1	1	11,50	1610,00
7	-1	1	1	17,90	1340,00
8	1	1	1	13,00	1560,00
9 (C)	0	0	0	5,50	1870,00

A partir dos resultados obtidos para as respostas analisadas, efetuou-se, para cada uma das respostas, uma regressão múltipla, tendo como fatores, os termos isolados, as interações e os quadráticos das três variáveis estudadas.

VARIÁVEL DE RESPOSTA – TENSÃO SUPERFICIAL (TS)

Somente ignorando as interações entre as variáveis é possível obter um gráfico de Pareto (Figura 6) e identificar as principais variáveis do processo. Tendo como intervalo de confiança de 95%. Nesse gráfico, as variáveis relevantes para o processo são aquelas cujos valores a partir do qual seus efeitos são significativos estatisticamente. É possível observar que para os níveis estudados apenas o nível de açúcar cristal foi significativo, apresentando um efeito positivo na produção microbiana de surfactina.

Figura 6: Diagrama de Pareto do planejamento experimental para produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* a partir de resíduo de cervejaria onde a variável de resposta foi a redução percentual da tensão superficial.



Desconsiderando o resíduo de cervejaria tem-se o gráfico de superfície de resposta (Figura 7) para se determinar as condições operacionais do processo. A figura indica que se empregando concentrações maiores de açúcar cristal é possível estimular a síntese do biossurfactante, convergindo para uma condição ótima.

Na Figura 8 é apresentado o gráfico das médias marginais que relaciona as variáveis avaliadas, considerando-se um limite de confiança de 95%. A partir dessa Figura, verifica-se a existência de uma interação significativa no planejamento experimental fatorial entre as variáveis teor de nitrato e teor de açúcar cristal, visto que as linhas dos níveis -1 e +1 tendem a se cruzar, o que indica a existência de uma interação entre elas, no maior nível avaliado de teor de resíduo (60 mg/L).

Figura 7: Gráfico Curva de contorno do planejamento experimental para produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* a partir de resíduo de cervejaria onde a variável de resposta foi a redução percentual da tensão superficial.

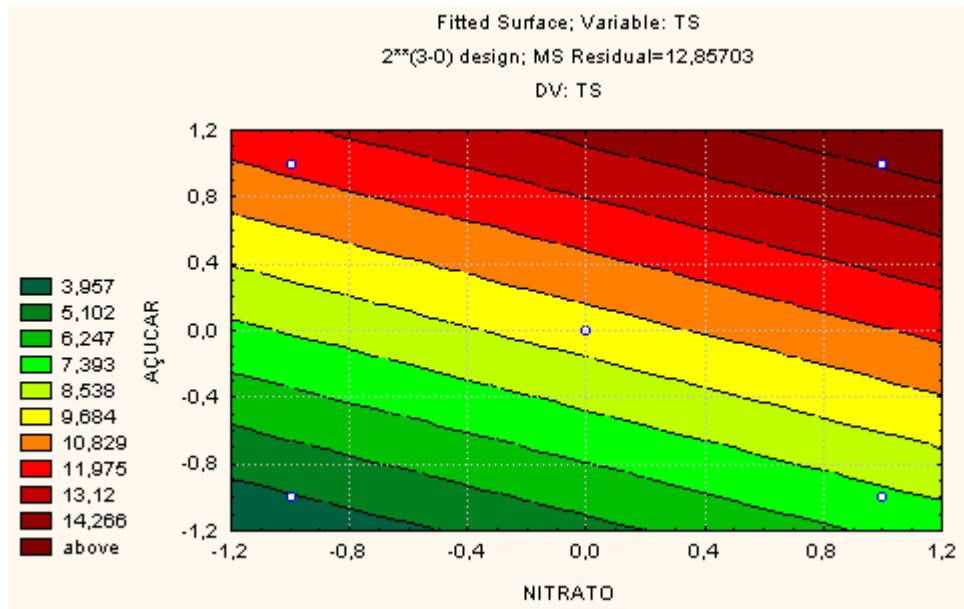
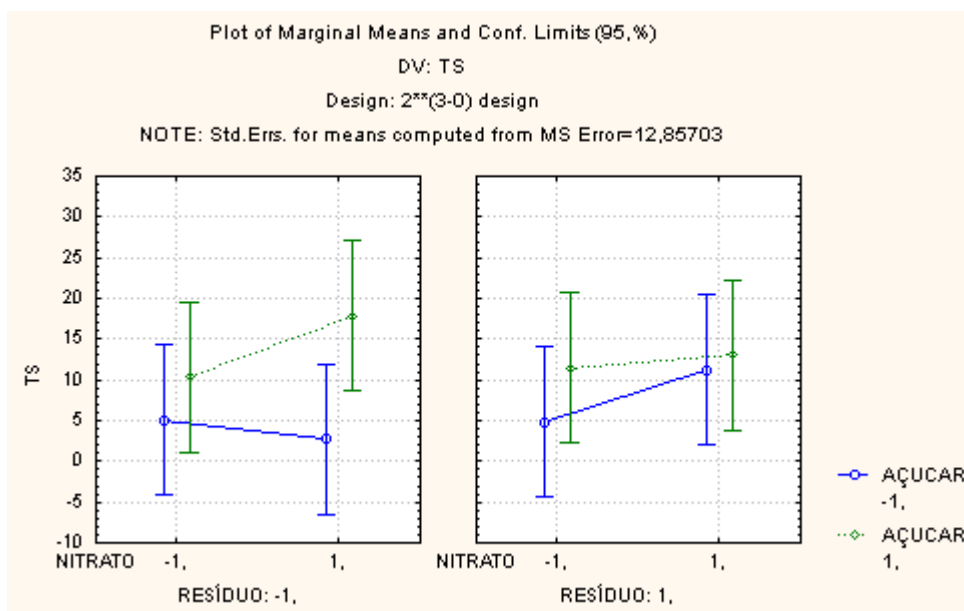


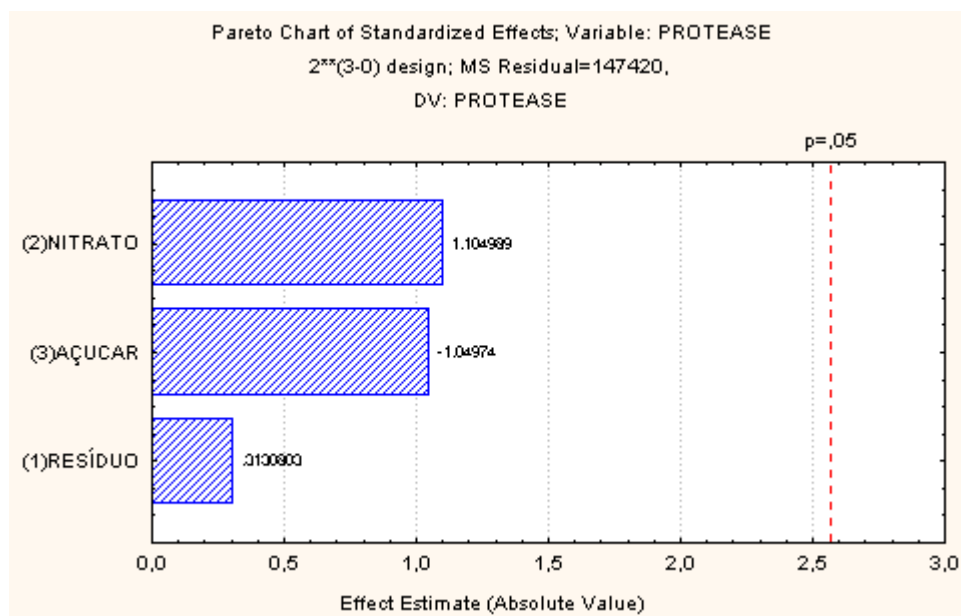
Figura 8: Gráfico das Médias Marginais do planejamento experimental para produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* a partir de resíduo de cervejaria onde a variável de resposta foi a redução percentual da tensão superficial.



VARIÁVEL DE RESPOSTA – PROTEASE

Mesmo ignorando as interações entre as variáveis não foi possível obter um modelo que representasse o processo e identificasse as principais variáveis tendo como intervalo de confiança de 95%. Não há nenhuma variável significativa que favoreça a produção de proteases.

Figura 9: Diagrama de Pareto do planejamento experimental para produção de biossurfactante por *Bacillus subtilis* a partir de resíduo de cervejaria onde a variável de resposta de produção de proteases.



6 CONCLUSÕES

Com base nos estudos realizados neste trabalho, pode-se concluir que:

- A linhagem *B. subtilis* isolada de solo contaminado foi capaz de produzir compostos tensoativos e proteases a partir de levedura inativa seca de cervejaria.
- Nas condições ensaiadas, a síntese de proteases foi influenciada positivamente pela adição de nitrato.
- Quanto maior a razão Carbono/Nitrato, maior a produção de proteases em relação a produção de biossurfactantes.
- A produção de biossurfactante foi intensificada pela adição combinada de açúcar cristal e nitrato de sódio.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ-SANCHEZ, M.E.A.; AVILA-GONZALEZ, L.; BECERRIL-GARCIA, C.; FATTEL-FACENDA, L.F.; ORTEGA-LOPES, J.; ARROYO, R. 2000. A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in citotoxicity. *Microbial Pathogenesis*, 28;193-202

DEMARTINO, G.N. 1989. Purification of proteolytic enzymes: In: *Proteolytic Enzymes: A practical approach*. Beynom, R.J. (eds). Academic Press, Oxford. U.K.

CABALLERO-CÓRDOBA, G.M.; PACHECO, M.T.B.; SGARBIERI, V.C. 1997. Composição Química de biomassa de levedura integral (*Saccharomyces cerevisiae*) e determinação do valor nutritivo da proteína, em células integras ou rompidasmecanicamente. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 17(2):102-106

CABRAL FILHO, S.L.S. 1999. Avaliação do resíduo de cervejaria em dietas de ruminantes através de técnicas nucleares e correlatadas. Piracicaba : [s.n].

CLAUS, D.; BERKELEY, R.C.W. 1984. In: KIEG, N.R, HOLT,J.G. (ed). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, London: Ed Williams, Wilkins Co., v.II, p. 1104-1130.

DAVIS, D.A.; LYNCH, H.C.; VARLEY, J. 1999. The production of surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC21332 cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 28(4-5): 346-354.

DAVIS, D.A.; LYNCH, H.C.; VARLEY, J. 2001. The application of foaming for the recovery of surfactin from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 28(4-5): 346-354.

HALÁSZ, A.; LÁSZTITY, R. 1991. Use of yeast biomass in food production. CRC Press, Boca Raton.

KINSELLA, J.E.; SHETTY, H.J. 1978. Yeast protein recovery, nutritional and functional properties. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 107(5):797-825.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193:265-275.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; PARKER, J. 2003. *Brock Biology of Microorganisms*, 10th edition, Prentice Hall/Pearson Higher Education Group, Upper Saddle River, NJ. ISBN 0-13-066271-2.

NITSCHKE M.; PASTORE G.M. 2002. Biosurfactantes: propriedades e aplicações *Química Nova*, 25(5): 772-776.

PINHEIRO-ROBERG, R.A. 2000. Aproveitamento de efluentes industriais para produção de biomassa entomopatogênica a base de *Bacillus sphaericus*. Orientador: Eliana Flávia Camporese Sérulo. Rio de Janeiro, EQ/UFRJ, Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos).

RAMANA, V.K.;KARANTH, N.G. 1989. Production of biosurfactants by the resting cells of *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6. *Biotechnology Letters*, 11(6): 437-442.

RAO, M.B.; TANKSALE, A.P.; GHATGE, M.S., DESHPANDE, V.V. 1998. Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62 (3):597-635.

RAWLING, N.D., BARRET, A. 1994. Families of aspartic peptidases, and those of unknown mechanism. *Methods in Enzymology*, 248: 105-120.

RAWLING, N.D., BARRET, A. 1994. Families of cysteine peptidases,. *Methods in Enzymology*, 244: 461-486.

RAWLING, N.D., BARRET, A. 1994. Families of metallopeptidases. *Methods in Enzymology*, 248: 183-228.

RAWLING, N.D., BARRET, A. 1994. Families of serine peptidases. *Methods in Enzymology*, 244: 18-61.

SGARBIERI. V.C.; ALVIM, I.D.; VILELA, E.S.D.; BALDINI, V.L.S.; BRAGAGNOLO, N. 1999. Produção piloto de derivados de levedura (*Saccharomyces* sp.) para uso como ingrediente na formulação de alimentos. *Brazilian Journal of Food Technology*, 2(1,2):119-125.

TREVAN, M.D. 1990. Biotecnología: principios biológicos. Trevan, M.D. *et al* (ed.). Zaragoza: Acribia.

VANANUVAT, P. 1977. Value of yeast protein for poultry feed, *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 9(4): 325-343.

WALSIEEN, C.I.; CALLOWAY, D.H.; MARGEN, S., COSTA, F. 1970. Uric acid levels in men fed algae and yeast as protein sources. *Journal of Food Science*, 35(2):293-298.

WALSIEEN, C.I. 1975. Unusual source of protein for man, *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 6(1):77-151.

