

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

ESTUDO DA UTILIZAÇÃO DO VINHOTO COMO
SUBSTRATO PARA O CRESCIMENTO DE
LEVEDURAS E BACTÉRIAS FIXADORAS
DE NITROGÊNIO DE VIDA LIVRE

RICARDO VERTHEIN TAVARES DE MACEDO
ENGENHEIRO QUÍMICO

ORIENTADORA: PROFA. DRA. IRACEMA DE OLIVEIRA MORAES

TESE APRESENTADA A FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS DA UNI-
VERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MES-
TRE EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS.

Parcer.

*Este exemplar corresponde a redação final da
Tese defendida por Ricardo Verthein Tavares
de Macedo e aprovada pela Comissão Julgadora
em 18 de outubro de 1991.*

J. Moraes

BANCA EXAMINADORA

I. Moraes

PROF.^A DR.^A IRACEMA DE OLIVEIRA MORAES

PROF. DR. JOSÉ LUIZ PEREIRA

Paschoal Guimarães Robbs

PROF. DR. PASCHOAL GUIMARÃES ROBBS

Ranulfo Monte Alegre

PROF. DR. RANULFO MONTE ALEGRE

Aos meus filhos
Bárbara, Ricardo Antonio,
Gabriela e Hudson.

AGRADECIMENTOS

Os meus agradecimentos as pessoas e instituições que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

À ABIA pela confecção da tese.

Ao Prof. Paschoal G. Robbs pelo apoio e utilização do Laboratório de Fermentação do DTA/UFRRJ.

Ao Departamento de Solos do IA/UFRRJ pela utilização do Laboratório de Microbiologia do Solo.

À Dra. Johanna Döbereiner, Centro Nacional de Biologia de Solos - EMBRAPA-RJ, pela utilização do Laboratório de Microbiologia de Solos nas análises de nitrogênio e doação de cepas de B.F.N.

Ao Laboratório da FEEMA-RJ, pela realização das análises de D.B.O., D.Q.O. e outras, da matéria prima e dos experimentos representativos.

Ao Eng. Luiz Mário Baccarin, Laboratório da Coopersucar - Sertãozinho, Piracicaba-SP, pelas análises de composição da matéria prima e contatos com a Usina Costa Pinto.

À Usina Costa Pinto, Piracicaba-SP, e ao Eng. Francisco pela doação da matéria prima para a execução dos experimentos.

À Dra. Alaides P. Ruschell e Dra. Maria José A. Sampaio, CENA, Piracicaba-SP, pela doação de cepas de B.F.N. e consultas.

Ao Laboratório de Bioengenharia da FEA, UNICAMP, pelos testes preliminares, doação de cepas de leveduras e outras.

Aos alunos de graduação e/ou estagiários, Fernando José de Barros, Paulo Roberto de C. Seixas, Antonio Carlos da Silva, Patrícia Schuller de Oliveira, Carlos Augusto S. Valente, Simone Martins da Silva, pelo interesse, participação e colaboração durante os experimentos.

Aos Funcionários da UFRRJ, Enoque Pedrosa M. Filho, pelo apoio, Suely A. Borret e Sonia Regina de Albuquerque, pela datilografia inicial e Marcia da Silva Ricardo de Aguiar, por toda a datilografia final.

Aos Funcionários do CNPBS - EMBRAPA-RJ, Carlos Alberto Gonçalves Cavalcante e Luciano Henrique Lourenço, pelo apoio e análises estatísticas no Centro de Métodos Quantitativos, Vanderlei de Oliveira Andrade e José Antonio Ramos Pereira, pelo apoio nas análises no Laboratório e Jair de Jesus Melo pelas Figuras dos diversos experimentos.

Ao atual Chefe do DTA/UFRRJ, Prof. Pedro Paulo de O. Silva, e demais colegas que direta ou indiretamente contribuíram para a consecução deste trabalho.

Especialmente a minha Esposa e meus pais, pelo apoio e estímulo imprescindíveis na realização e finalização deste trabalho.

À minha Orientadora Dra. Iracema de O. Moraes, pela consideração, paciência e apoio à realização e a concretização final desta Tese.

RESUMO

Foi estudado o crescimento misto de *C. utilis* com *Beijerinckia sp* e *C. utilis* com *A. vinelandii* em substrato de vinhoto suplementado com Na_2HPO_4 , visando-se observar o aumento do nitrogênio promovido pelas Bactérias Fixadoras de Nitrogênio (B.F.N.) de vida livre, e sua utilização pelas leveduras em termos do aumento do peso de células, como também da diminuição da carga poluidora deste resíduo.

O cultivo foi feito em frascos de erlenmeyers de 500 ml com 100 ml de meio, à temperatura ambiente, 25 - 30°C, onde em cada amostragem foram feitas determinações de nitrogênio total, densidade ótica da suspensão, número de células e pH. As determinações de D.B.O., D.Q.O., Nitrogênio Orgânico e Amoniacal foram realizadas pela Fundação Estadual de Engenharia do Meio Ambiente (FEEMA).

O crescimento misto em vinhoto suplementado com Na_2HPO_4 0,1%. mostrou um aumento significativo do nitrogênio, em forma de exponencial simples independente das fases de crescimento da levedura, da ordem de 22% em 60 horas de cultivo, quando comparado com a cultura pura no mesmo meio. Isto acarretou

aumento significativo do peso seco de células da ordem de 20%, em 36 horas, e do número total de células de levedura da ordem de 22% em 48 horas, para a cultura mista, comparada com o aumento do peso seco de células e do número total de células de levedura em cultura pura.

Houve abaixamento da D.B.O. em torno de 73% e da D.Q.O. em torno de 76% em cultura mista, contra 50% e 44% respectivamente em cultura pura.

ABSTRACT

Alcohol stillage was used as growth medium for microorganisms in three different treatments: in the first treatment it was inoculated a mixture of *C. utilis* + *Beijerinckia* sp, in a second *C. utilis* + *A. vinelandii* and in a third a culture of pure yeasts cells. An addition of Na_2HPO_4 was made in all three cases.

The main objectives were to investigate the increase in nitrogen content produced by wild "Nitrogen Fixing Bacterias - B.F.N.", to observe the increase in number of yeast cells and the effect of the treatment on the pollutant power of the residue.

The growth was carried out in erlenmeyers flasks of 500 ml having 100 ml of the growth medium, at 25 - 30°C. The determination of total nitrogen, optical density, cell number, pH, were made in each sample. B.B.O., D.Q.O., Amoniacal and Organical Nitrogen determinations were made by FEEMA, at the end of representatives experiments.

The results showed a exponential increase 22% in nitrogen content after 60 hours, when compared to the nitrogen content during pure culture growth. There were also significant

increase 20% in all dry weight. It was observed a significant higher growth 22% in yeast cells, grown as mixed type culture, when compared to the numbers obtained during pure culture growth.

The B.O.D. decreased 73% and C.O.D. 76% in mixed type culture, 50% and 44% in pure yeast culture growth respectively.

ÍNDICE

	Página
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	6
1. Vinhoto ou Vinhaça	6
1.1. Utilização como Fertilizante	7
1.2. Produção de Metano	8
1.3. Produção de Biomassa por Fermentação Aeróbica	8
2. Obtenção de Biomassa Microbiana	14
2.1. Fungos	14
2.2. Leveduras	17
2.3. Bactérias Fixadoras de Nitrogênio	34
2.4. Cultura Mista	43
3. Cinéticas de Crescimento	45
MATERIAL E MÉTODOS	49
1. Microrganismos	49
2. Meios de Cultura	50
3. Matéria Prima	51
4. Metodologia	53
4.1. Preparo do inóculo de <i>Beijerinckia sp</i> e <i>Azotobacter vinelandii</i>	53
4.2. Preparo do inóculo de <i>Candida utilis</i>	54

	Página
4.3. Condições de fermentação	55
4.4. Relação Peso Sexo X Densidade Ótica	55
4.5. Contagem de Células	56
4.6. Determinação de Nitrogênio Total	56
4.7. Determinação de D.B.O. ₅ ; D.Q.O.; Nitrogênio; Análises Físico-Químicas	56
4.8. Métodos Matemáticos Utilizados	57
4.8.1. Cinética de Crescimento	57
4.8.2. Cinética do Acúmulo do Nitrogênio	58
4.8.3. Análises Estatísticas	59
RESULTADOS	60
DISCUSSÃO	64
1. Crescimento de <i>C. utilis</i>	65
2. Crescimento Simultâneo de <i>C. utilis</i> e B.F.N.	66
3. Aumento do Nitrogênio	69
4. Redução da D.B.O. e da D.Q.O.	70
5. Parâmetros Cinéticos	72
CONCLUSÕES	116
SUGESTÕES E RECOMENDAÇÕES	118
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120

INTRODUÇÃO

Torna-se imperioso o aumento da produção de álcool para atender à crescente demanda de consumo no Brasil, exigida pela utilização cada vez maior nos motores a explosão, consagrando-se assim como a grande alternativa de um combustível de fonte renovável, tanto a curto como a médio e longo prazos. Sabe-se porém que, para a produção de cada litro de álcool corresponde a produção de 15 litros de vinhoto ou vinhaça, em média, como resíduo da destilação.

A estimativa de produção de álcool, em torno dos 15 bilhões de litros por ano, leva a uma produção de vinhoto de cerca de 225 bilhões de litros por ano (15 litros de vinhoto para cada litro de álcool).

A vinhaça ou vinhoto possuindo de 10.000 a 30.000 ppm. de D.B.O. - Demanda Bioquímica de Oxigênio, quando descarregada diretamente nos rios, provoca efeitos desastrosos, principalmente à fauna e à flora existentes, devido a exaurir rapidamente o oxigênio dissolvido na água. A situação se agrava ainda mais pela alta temperatura de saída da coluna de destilação e seu baixo pH, pois nestas condições a solubilidade do oxigênio é dimi-

nuída e a atividade vital presente nas águas aumentada, necessitando de quantidades bem maiores de oxigênio. Além disso, a época em que normalmente ocorrem despejos, durante o período de safra da cana, coincide com a época de seca na maioria das regiões canavieiras, em que a vazão dos rios está em limites inferiores, salvo raras exceções.

Ultimamente vem se adotando a aplicação do vinhoto diretamente nas soqueiras de cana, porém não se sabe se esta é uma prática benéfica, visto que com o tempo haverá acúmulo de sais de potássio, bem como o desequilíbrio físico-químico e biológico do solo, acarretando um desgaste irreversível.

Do ponto de vista bioquímico, o vinhoto é considerado um caldo nutriente, podendo ser aproveitado como matéria prima ou substrato para várias finalidades, tais como:

1. Utilização in natura, como fertilizante.
2. Concentração e extração de componentes.
3. Secagem e utilização como suplemento de rações.
4. Fermentação anaeróbica com produção de metano.
5. Fermentação aeróbica com produção de biomassa.

Os processos físico-químicos de tratamento do vinhoto são de alto custo, sendo dificultados principalmente devido à grande quantidade de água presente (cerca de 95%), a qual exige dispêndio elevado de energia para ser separada da parte de interesse, tanto para reaproveitamento quanto para não permitir a poluição das águas de despejo. Isto leva a deduzir que os processos fermentativos de tratamento são mais viáveis economicamente, podendo se observar na prática a possibilidade de se reduzir a D.B.O., como forma de tratamento primário, com a produção de uma biomassa, fazendo com que o despejo restante, já com uma carga poluidora baixa, esteja em condições de ser processado como tratamento secundário.

É viável realizar processos fermentativos aeróbicos, visto o vinhoto ser rico em carbono e alguns sais como de potássio e cálcio, tornando-se potencialmente uma fonte importante de matéria prima na preparação de substrato para crescimento de microrganismos. Será necessária uma suplementação de nitrogênio e fósforo para se tornar um caldo adequado para fermentação. Esta suplementação é feita normalmente utilizando-se uréia e compostos fosfatados, ou fosfato de amônia, inviabilizando economicamente um processo em maior escala pois os compostos nitrogenados são de alto custo, sendo estas portanto as principais restrições à escolha deste processo em indústrias, como tratamento primário do vinhoto. Os sais de fósforo bem como as bases fortes (hidróxido de sódio, hidróxido de potássio) são de custos acessíveis no mercado, para a utilização em grande escala.

Dos microrganismos com potencial de crescimento em vinhoto, que possam produzir uma biomassa celular em qualidade e quantidade razoáveis destacam-se os fungos filamentosos e as leveduras; é mais factível a utilização de leveduras visto a existência de problemas de contaminação quando são utilizados fungos filamentosos em vinhoto, conforme descrição de alguns autores. Das cepas de leveduras, a mais utilizada é a *Candida utilis* devido a sua rusticidade e adaptação em tipos diferentes de substrato, principalmente em baixos valores de pH, daí sua escolha como o microrganismo mais adequado.

É importante estudar a possibilidade da utilização de uma fonte de compostos nitrogenados a um custo mínimo, para o aproveitamento no crescimento de *Candida utilis*, desenvolvendo uma cultura de bactérias fixadoras de nitrogênio simultaneamente com a levedura.

As bactérias fixadoras de nitrogênio por metabolizarem o nitrogênio do ar, fonte inesgotável deste elemento, têm um po

tencial muito grande como geradoras de compostos nitrogenados utilizáveis por outros microrganismos, o que poderá tornar o processo de fermentação aeróbica do vinhoto bastante vantajoso em relação a outros tratamentos.

Cumpra ainda ressaltar que algumas bactérias fixadoras de nitrogênio estão presentes na rizosfera das soqueiras da cana-de-açúcar, o que também indica a possibilidade de retorno do material tratado com estas bactérias ao canavial, já em condições melhores e bem diferentes das que existiam no vinhoto in natura, como fertilizante biológico.

Objetivos

Este trabalho tem como principais objetivos:

- 1) Escolher dentre algumas cepas de bactérias fixadoras de nitrogênio de vida livre as que melhor se adaptem às condições que um substrato de vinhoto apresenta, desenvolvendo estudos preliminares do comportamento destas.
- 2) Avaliar a capacidade de fixação de nitrogênio das cepas escolhidas, em vinhoto, desenvolvendo curvas de crescimento em meios formulados para esta finalidade.
- 3) Estudar e comparar o efeito sinérgico do crescimento de *C. utilis* em um sistema tradicional de cultivo, com meios suplementados com nutrientes ni

trogenados, e em sistemas associados com bactérias fixadoras de nitrogênio, sem suplementação de nutrientes nitrogenados.

- 4) Obtenção de alguns parâmetros cinéticos, em função destes resultados obtidos pelos estudos preliminares do crescimento simultâneo de *Candida utilis* e bactérias fixadoras de nitrogênio, em vinhoto em escala de laboratório.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. VINHOTO OU VINHAÇA

De acordo com informações da Coopersucar, Boletim Técnico da Coopersucar (51), vinhoto ou vinhaça representa a maior vazão de saída do processo de destilação do álcool de cana-de-açúcar, 13 a 17 litros por litro de álcool.

A quantidade bem como a qualidade, é função tanto da matéria prima utilizada como da condução do processo de destilação.

As aplicações principais tecnicamente viáveis para o vinhoto no Brasil podem ser englobadas em:

1. Fertilização de solos;
2. Produção de metano - Fermentação anaeróbica;
3. Produção de Biomassa - Fermentação aeróbica.

O valor nutricional do vinhoto em função da natureza do mosto pode ser avaliado pois é um resíduo rico em material orgânico e potássio, e pobre em nitrogênio e fósforo. Apresenta teores apreciáveis de cálcio, magnésio, enxofre e outros minerais em menores quantidades (Tabela 1).

Tabela 1: Composição da vinhaça em kg/m³.

Elementos	Mosto de Melaço	Mosto Misto	Mosto de Caldo
Nitrogênio (N)	1,18	0,70	0,28
Fósforo (P ₂ O ₅)	0,15	0,11	0,13
Potássio (K ₂ O)	7,83	4,57	1,22
Cálcio (CaO)	3,64	1,72	0,69
Magnésio (MgO)	0,99	0,66	0,21
Sulfato (SO ₄ ⁼)	6,40	3,73	0,62
Carbono (C)	19,20	11,50	5,90
Matéria Orgânica	63,40	38,0	19,50
Relação C/N	16,27	16,43	21,07

No exterior os estudos realizados dizem respeito a vinhoto obtido do processamento de beterraba, sendo que SOBCZAK e KULASEK, estudaram a utilização do vinhoto em alimentação animal, com suplementação de magnésio, visto que o alto conteúdo de potássio perturba o metabolismo.

1.1. Utilização como Fertilizantes:

A utilização "in natura" como fertilizante é uma das alternativas a curto prazo, porém limitante quanto a quantidade utilizada bem como ao tipo de solo em que é aplicada, visto que provoca abaixamento de pH e algumas alterações, que a longo prazo podem acarretar problemas mais graves (51).

1.2. Produção de Metano:

A produção de metano por processo anaeróbico pode gerar até 20% das necessidades térmicas da destilaria e abaixar bastante o poder poluente do vinhoto, que tem de 1 a 5% de sólidos, sendo uma outra alternativa. Porém esta constitui uma solução parcial, sendo economicamente inviável em destilarias que utilizam a cana-de-açúcar como matéria prima, pois estas contam com o bagaço em abundância. Além disso o rendimento em metano é baixo e o resíduo apresenta uma D.B.O. alta, acarretando um alto custo do produto (51).

1.3. Produção de Biomassa por Fermentação Aeróbica:

A obtenção da biomassa se dá por um processo fermentativo aeróbico em que o substrato para a propagação dos microrganismos é o vinhoto suplementado. Este não deve ser encarado como uma solução global e sim como uma opção complementar.

É necessário se fazer tratamento especial após este processo para diminuir ainda mais a D.B.O. Esta parece não ser uma alternativa economicamente recomendável a nível industrial, embora tenham se obtidos bons resultados em planta piloto.

A biomassa para uso em rações animais deve ser consumida em regiões próximas às destilarias devido ao alto custo de transporte bem como às dificuldades de estocagem do produto (51).

CAMHI, J.D. confirma as possibilidades do aproveitamento do vinhoto, numa destilaria trabalhando com melaço de cana-de-açúcar como matéria prima, com D.B.O.₅ a 20°C de 2,31 a 2,89%, citando valores de até 5%, com recuperação econômica ana

lisada usando-se as seguintes alternativas: Retorno à lavoura; Concentração do vinhoto, Fermentação do vinhoto; Oxidação Biológica em lagoas (35).

KUJALA, P., et alii estudaram os problemas de disposição do rejeito de destilarias em países como Taiwan, Brasil, etc, onde registram-se D.B.O. variando de 10.000 ppm a 60.000 ppm, a partir de vários tipos de matérias primas. O autor exemplifica com uma destilaria que descarrega 1.000 m³/dia de vinhoto (M.A.S. - Meters of Alchool Stillage), com nível de D.B.O.₅ de 35.000 ppm, a qual teria um equivalente populacional (P.E.) de 625.000 habitantes, em termos de poluição, apresentando grandes problemas quanto à eliminação de sua carga poluidora. Um número de sistemas foi pesquisado e avaliado para determinar o rendimento relativo entre custos fixos e custos operacionais variáveis. Os principais métodos considerados para tratamento de despejos de vinhoto foram:

- 1) Tratamento aeróbico convencional de despejos em água, usando lodo ativado.
- 2) Digestão anaeróbica para combustível de metano para caldeira e lodo fertilizante.
- 3) Evaporação para um xarope para alimentação animal
- 4) Evaporação e incineração em leito fluidizado para um produto de potássio cru.
- 5) Evaporação e incineração em leito fluidizado com um tratamento para um produto de sais de potássio refinado.
- 6) Produção de biomassa com despejo de água de alto D.B.O.

O autor comenta que na produção de biomassa com despejo de água de alto D.B.O., a indústria alcooleira de Taiwan tem tido considerável experiência no cultivo de leveduras em vinhoto, desde 1962. Foram realizados experimentos utilizando diferentes tipos de leveduras, particularmente com uma cepa local, *Pichia tianania* isolada do solo. Segundo o autor, esta levedura, muito produtiva a nível de laboratório, com teor de proteína de 49%, não produziu resultados satisfatórios quando foram feitos testes em escala de usina em 1973. Entretanto, testes com *Candida utilis* NRRL-Y-900 deram excelentes resultados, apesar do rendimento e do conteúdo de proteína bruta não se aproximarem dos altos valores obtidos por *Pichia tianania* em provas de laboratório.

Os rejeitos de Taiwan têm normalmente um conteúdo de D.B.O. de aproximadamente 60.000 ppm, e contêm também resíduo médio de açúcar elevado, cerca de 1,3 g/100 ml com BRIX aproximado de 12 a 13 e pH em torno de 4,5. Devido a alta taxa de matéria orgânica, em torno de 7,6 g/100 ml, obtém-se um bom meio para cultura de leveduras. Em fermentador aeróbico em uma fábrica de pequena escala, obtém-se 1 ton. de levedura seca, com conteúdo médio de proteína bruta de 46%, para cada 60 a 65 ton. de vinhoto.

Em fermentação de laboratório e em fábricas, o pH aumenta rapidamente a 6,8 a 7,9 durante a formação da levedura, indicando que a maior parte da energia está sendo utilizada de ácidos voláteis, ácido lático e outros ácidos orgânicos combinados no vinhoto (104).

Os mesmos autores citam que FRENCH em 1974 descobriu que sais minerais de despejo de melaço inibem a fermentação, particularmente sais de potássio. Uma regra geral é que os me-

lhores resultados de fermentação são encontrados quando o vinho to é diluído do correspondente a 20 litros por litro de álcool produzido.

Citam ainda que pesquisadores russos estudaram a fabricação de levedura para a alimentação, utilizando uma partida de vinhoto de melaço de beterraba, diluído para dar uma concentração final de sólidos correspondente a 5,0 a 5,2% e indicaram uma redução em matéria seca de 37% após a propagação de levedura, enquanto que a redução obtida no processo em Taiwan foi de aproximadamente 29% em conteúdo de matéria seca. Vinhoto de melaço de beterraba e de cana são diferentes em conteúdo de matéria orgânica, sendo o conteúdo das cinzas de vinhoto de melaço de cana 40% maior do que o de beterraba. KUJALA et alii confirmaram ainda que a propagação das leveduras foi sustentada a um alto grau por ácidos orgânicos e glicerol do vinhoto, preferencialmente às substâncias reduzidas e mostraram a redução de 47% a 80% de D.B.O.₅ na fermentação de levedura alimentar, sendo entretando as cargas de D.B.O. iniciais relativamente baixas comparadas com as de vinhoto convencional de cana (104).

Quanto a economicidade do processo, os mesmos autores acreditam que em outras regiões do mundo torne-se necessário quantidades acima de 100 ton. de vinhoto para o rendimento de 1 ton. de levedura alimentar seca, tendo isto um efeito adverso na economia de produção. Além do mais, dependendo do nitrogênio residual, conteúdo de fosfatos no vinhoto e suas possibilidades de agirem como nutrientes para o crescimento das leveduras, a viabilidade da produção pode ser mais uma vez depreciada, pois o nitrogênio e nutrientes fosfatados suplementares podem chegar a 50% ou mais dos custos de produção.

Outro alto custo é a potência elétrica, sendo principalmente usada devido a necessidade de aeração, pois 400 volumes de ar são necessários por volume de vinhoto. Também a produção de levedura alimentar exige remoção de considerável quantidade de calor durante a sua produção. Como a temperatura ótima para a fermentação é de 32°C, isto cria problemas nos esquemas de resfriamento nos países tropicais e semi-tropicais. Aproximadamente 3,87 kcal/kg de material seco de levedura é produzido durante a fermentação, o qual deverá ser continuamente removido ou a atividade do microrganismo cessará.

Quando a temperatura média para o resfriamento do meio está em torno de 30°C, grandes volumes de água são necessários para remover este calor. Logo em alguns países, o uso de sistema de refrigeração com água torna-se necessário, afetando negativamente a economia de operação, onde a exigência de potência poderá elevar de 20% a 25% o custo de produção. Após a separação da levedura, o despejo sai com D.B.O.₅ ainda elevada, e outro processamento se faz necessário.

O conteúdo mineral do vinhoto deve ser extremamente alto, se evaporado para um xarope para alimentação animal, e se o xarope for incinerado, o conteúdo de calor da combustão deve ser suficiente para alimentar a carga de evaporação.

A fabricação de levedura alimentar como tratamento secundário de despejo para uma redução significativa da D.B.O.₅, envolverá alto custo de investimento, e a exequibilidade econômica do processo dependerá também do rendimento e da comercialização do produto. Todos os métodos estudados para a diminuição da poluição do vinhoto são dispendiosos em termos de investimentos com a planta e com o custo de operação (104).

BITTENCOURT, V.C. et alii mostram que para um melhor entendimento da composição do vinhoto, deve-se inicialmente fazer algumas considerações a respeito das propriedades químicas dos caldos e dos processos que modificarão suas características. Analisando as diversas correlações lineares entre os teores dos vários constituintes, os autores verificaram que os coeficientes de correlação são normalmente baixos, com exceção dos pares $K \times PO_4$ e cinzas ($Ca + K + Mg$) e que não parece existir quaisquer relações entre os teores dos diversos elementos nos caldos, sendo suas concentrações mais dependentes do caráter varietal e das condições locais de clima e de solo do que de uma característica inerente à própria planta. Consequentemente é difícil até certo ponto se prever uma composição geral para o vinhoto com base numa análise isolada do solo.

Nas condições das usinas paulistas é comum a adição de fosfatos e polifosfatos que momentaneamente vão enriquecer o caldo em P. Porém a adição deste não tem qualquer efeito sobre a concentração deste elemento no caldo clarificado, e consequentemente no vinhoto, conforme os autores (21).

A partir da comparação da análise de 28 amostras de vinhoto, obtidas do mel final das usinas, o teor de Ca no vinhoto tende a decrescer em relação ao do caldo clarificado, sendo que os autores consideram que as perdas deste elemento devem ocorrer durante as etapas de fabricação. A relação MgO/K_2O também apresenta este decréscimo, porém em menor intensidade. O fósforo não sofre perdas a partir do caldo clarificado, podendo ser calculado diretamente a partir do teor no caldo clarificado. O potássio é o elemento que passa por todo o processo sem sofrer alteração, apresentando no vinhoto um teor de aproximadamente 4 vezes o do caldo clarificado ($5,12 \text{ Kg } K_2O/m^3$ vinhoto e $1,27$

Kg/m³ caldo clarificado). Os constituintes N, P, S, Mg e K se apresentam predominantemente na forma mineral, não estando ligados à matéria orgânica (21).

Em se tratando da utilização do vinhoto, MAGRO, J.A. cita que na Usina da Pedra, Serrana, foi utilizado o vinhoto para irrigação e fertilização da cana, considerando ser um fertilizante orgânico com alto teor de potássio, médio de nitrogênio e baixo em fósforo. Alguns efeitos da sua utilização em irrigação que puderam ser detectados foram o aumento sensível do pH dos solos e o aumento dos teores de K⁺, Ca²⁺. Além disso as plantas que receberam tratamento, vegetam muito, acamam com facilidade, se tornam quebradiças e o vinhoto interfere diretamente na qualidade do açúcar provocando aumento do teor de cinzas. A aplicação de grandes quantidades acarretam dificuldades de maturação da cana. Apesar da irrigação custar mais do que o adubo, produz-se 12 ton/ha a mais com uma média de 5 cortes contra 4 da área adubada, além de não precisar de calagem e fosfatagem.

Conforme o autor, o resíduo de destilaria não só substitui o adubo mineral, como possui propriedades consideradas superiores, nas dosagens estudadas e, mesmo acarretando certas desvantagens, não é possível aceitar a idéia de poluir o ambiente onde vivem comunidades com um produto valioso como o vinhoto (120).

2. OBTENÇÃO DE BIOMASSA MICROBIANA

2.1. Fungos

A F.A.O., segundo LAMO, P.R. e MENEZES, T.J.R. avaliou que enquanto a produção mundial de carne deverá aumentar a

uma taxa de 1,8% ao ano, a demanda crescerá em 3% ao ano. Um deficit acumulado de 1,5 milhões de toneladas era esperado até o final da década de 1970. Estudo efetuado pela "Almoco Food's Co." mostra que a atual demanda de proteínas de 80 milhões de toneladas deverá elevar-se para 140 milhões até o ano 2.000.

Os autores procuraram evitar em sua pesquisa para produção de biomassa o uso de um processo fermentativo asséptico porque importava em utilizar equipamentos de aço inox, de alto custo inicial, e a recuperação da massa celular por meios simples, como filtração e tamização, mostram as vantagens do tratamento fúngico em relação ao lodo ativado, visto que os fungos incorporam grande quantidade de matéria orgânica em vez de oxidá-la.

Para determinar a composição do caldo de cultura, fizeram a avaliação periódica do vinhoto, que permitiu a suplementação com sais nutrientes; tomaram as médias de alguns valores, por exemplo, D.B.O.₅ = 30.000 mg/l, N₂ Total = 900 mg/l, Fosfatos Totais = 300 mg/l. Obedecendo a proporção de C:N:P de 50:5:1, utilizaram os seguintes valores para a suplementação:

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ - 2,6 g/l

Uréia - 1,2 g/l

Na_2HPO_4 - 1,0 g/l

Quando utilizado $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, chegou-se a um excesso de fosfatos de 9,9 g/l. Procederam a uma seleção de fungos disponíveis, determinando o que melhor utilizasse o vinhoto, medindo em demanda química de oxigênio - D.Q.O. e massa produzida, devido a serem medias rápidas.

Utilizando vinhoto natural, inicialmente resfriado a 30°C, sem suplementação e com os fungos disponíveis, *C. utilis* para comparação e também com flora natural; incubaram a 30°C,

250 rpm durante 72 horas, obtendo os resultados da Tabela 2 (105).

ARAÚJO, N.Q. et alii em trabalho realizado com equipes do INT e da F.T.I. considerando a opção de tratamento microbológico do vinhoto, enfoca o uso dos fungos filamentosos por se considerar na época, certas vantagens sobre as leveduras, tradicionalmente usadas na produção de proteína de microrganismo unicelular. Dentre alguns aspectos, destaca a maior eficiência na redução da D.B.O.₅ e maior facilidade na recuperação da biomassa produzida.

Tabela 2

Microrganismo	pH Final	Redução D.Q.O.	Biomassa Seca Unidade	Rendimento*
<i>A. oryzae</i> 18	8,6	48,3	14.900	0,88
<i>A. oryzae</i> 3	7,7	23,3	5.200	0,63
<i>A. oryzae</i> 13	8,7	30,1	7.900	0,58
<i>A. oryzae</i> 1988	6,0	29,5	6.200	0,52
<i>A. niger</i> 3	8,0	46,0	10.900	0,74
<i>A. niger</i> 27	5,9	19,1	3.900	0,51
<i>A. niger</i>	7,7	38,1	6.300	0,47
<i>P. elegans</i>	5,3	13,1	850	0,18
<i>T. viridae</i>	5,2	12,5	950	0,22
<i>G. deliquescens</i>	6,9	38,6	7.500	0,55
<i>C. utilis</i>	6,5	35,8	5.700	0,45
Flora natural	5,2	12,0	900	0,18

* Rendimento = Biomassa produzida/D.Q.O. consumido.

Os autores identificaram um problema de natureza biológica que impedia o crescimento normal do fungo selecionado, *Aspergillus oryzae* no vinhoto. Este problema relaciona-se com a presença de leveduras e bactérias que de algum modo prejudicavam o desenvolvimento do fungo.

Os resultados mostraram também que para se utilizar fungos filamentosos sensíveis aos contaminantes, seria necessário aumentar a eficiência do pré-tratamento a um grau tão elevado que o processo se tornaria anti-econômico e incerto quanto a bons resultados (9, 10).

DABBAH, R., analisando resultados de diversos autores, mostra a composição de proteína de fungos em comparação com outras fontes, proteína referência da F.A.O., congumelo e farinha de peixe. O autor cita que fungos são geralmente complexos multicelulares, organismos aeróbicos, crescendo bem sobre ampla faixa de pH, pressão osmótica, temperatura, e substratos de despejo. Eles são ricos em vitaminas do grupo B e contêm aproximadamente 30 a 60% de proteína. Mostra que o conteúdo de metionina da proteína de fungos é baixo, como também o conteúdo de triptofano, mas a proteína obtida é comparável à proteína do leite, farinha de peixe e a proteína de referência da F.A.O. (47).

THATCHER, F.S. analisou aspectos nutritivos e organolépticos de alimentos com biomassa fúngica, indicando que sua aceitabilidade é muito baixa enquanto que os custos são relativamente altos (218).

2.2. Leveduras

KIHLBERG, R. em avaliação de microrganismos como fonte de alimentos, enumera algumas vantagens destes sobre as plan

tas e os animais, como produtores de proteína:

1. Microrganismos têm um tempo muito pequeno de geração e podem prover um aumento rápido de massa. Sob as condições mais favoráveis, bactérias e leveduras tem um tempo de geração em torno de 0,5 a 2 e de 1 a 3 horas respectivamente, enquanto que para algas e fungos filamentosos variam de 2 a 6 e de 4 a 12 horas, respectivamente.
2. Microrganismos podem ser facilmente modificados geneticamente, mutações induzidas por meios químicos ou físicos, podem dar variantes com qualidades mais desejáveis.
3. O conteúdo proteico dos microrganismos é alto.
4. A produção de biomassa pode ser baseada em matérias primas de baixo custo, as quais estão disponíveis no local de produção em grandes quantidades, como celulose, carvão, petróleo ou gás natural.
5. A produção de biomassa pode ser efetuada em cultura contínua, independente de condições climáticas e com um pequeno espaço físico e pouca necessidade de água. Os problemas de disposição do despejo são relativamente pequenos, comparados com aqueles encontrados em muitos outros processos de produção de alimentos.

Segundo o autor considera que os gêneros mais usados em estudos de produção de biomassa são:

Algas: *Chlorella sp*; *Scenedesmus sp*; *Spirulina sp*.

Bactérias: *Bacillus* sp; *Hydrogenomonas* sp; *Methanomonas* sp; *Methylomonas* sp; *Pseudomonas* sp.

Lêveduras: *Cândida* sp; *Rhodotorula* sp; *Saccharomyces* sp.

Fungos filamentosos: *Aspergillus* sp; *Fusarium* sp; *Penicillium* sp.

Apresenta ainda, composição global de células microbianas, de acordo com a Tabela 3 (100).

Tabela 3: Composição média percentual com base em peso seco.

	Fungos Filamentosos	Algas	Leveduras	Bactérias
Nitrogênio	5 - 8	7,5 - 10	7,5 - 8,5	11,5 - 12,5
Gordura	2 - 8	7 - 20	2 - 6	1,5 - 3
Cinza	9 - 14	8 - 10	5 - 9,5	3 - 7
Ácidos nucleicos	-	3 - 8	6 - 12	8 - 16

DABBAH, R. mostra que as Nações Unidas através da junta F.A.O./W.H.O./UNICEF em 1964, indicam as exigências de segurança e adequabilidade nutricional de um novo alimento, para o consumo humano, como sendo:

- 1) O produto deve ter um alto conteúdo proteico.
- 2) A qualidade nutricional da proteína deve ser adequada.
- 3) O produto deve ter odor e sabor adequados para sua inclusão em matérias primas para alimentos.

- 4) Devem ser realizados ensaios em alimentação extensiva em animais para determinar o valor nutricional e segurança antes de ensaios para alimentação humana.

Como fontes não convencionais de proteínas foram incluídas proteínas microbianas. Em seu trabalho estudou leveduras, fungos, bactérias e algas como possíveis proteínas alimentícias (47).

O autor define levedura como microrganismos unicelulares, células ovóides ou elípticas, se reproduzem comumente por brotação, células maiores que bactérias (10 a 15 μ) e não motíveis. Elas geralmente crescem bem na faixa de 25 a 40°C (77 a 104°F) e podem tolerar alta acidez, da ordem de pH 3,5. As espécies mais comumente usadas na produção de proteínas para alimentos são: *Torulopsis utilis* (levedura tórula), *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces fragilis*.

Uma comparação da composição geral e da composição de vitaminas da biomassa obtida de leite integral seco, leite integral fluído e concentrado produzido pela British Petroleum (B.P.) apresenta-se na Tabela 4.

Tabela 4: Composição Geral Vitamínica

Composição Geral (%)	Levedura (%)	Leite Seco Integral (%)	Leite Fluido Integral (%)	B.P. (%) Proteína
Geral				
Proteína	50,0	26,5	3,5	43,6
Carboidratos	30,0	38,0	4,8	21,9
Gordura	2,0	27,0	3,8	18,5
Cinza	7,0	6,5	0,9	4,4
Umidade	4,9	2,0	87,0	7,0
Vitamínica (g/mg)				
Tiamina (B ₁)	150,0	3,4	0,44	3-16
Niacina (P.P.)	500,0	7,3	0,94	180-200
Biotina	1,0	0,3	0,031	-
Colina	2.500,0	862,0	121,0	-
Cobalamina (B ₁₂)	0,003	3,9	0,64	0,11
Riboflavina (B ₂)	50,0	15,5	1,75	75,0
Ac. Pantofênico	100,0	7,3	3,46	150-192
Pirodoxina (B ₆)	35,0	3,9	0,64	23,0
Ac. Fólico	30,0	0,018	0,0028	-

A composição de aminoácidos da proteína da levedura, compara-se favoravelmente com a proteína de referência da F.A.O., exceto pelo baixo teor de metionina, e é comparável com a da carne, pão e leite conforme a Tabela 5.

Tabela 5: Comparação da composição de aminoácidos de proteínas de diferentes fontes (mg/100g proteína).

Amino Ácidos	Proteína Referência F.A.O.	Levedura Torula	Carne	Leite	B.P. Proteína	Pão de Trigo
Arginina	-	7,22	7,5	4,28	5,0	4,0
Histidina	-	2,62	2,1	2,57	2,1	2,0
Isoleucina	4,2	7,50	3,3	4,28	5,3	3,5
Leucina	4,8	7,14	12,5	16,28	7,8	12,0
Lisina	4,2	8,28	8,3	7,43	7,8	2,0
Metionina	2,2	1,68	4,2	4,0	1,6	4,0
Fenilamina	2,8	4,82	4,6	5,71	4,8	5,5
Treonina	2,8	5,16	4,6	4,57	5,4	2,5
Triptofano	1,4	1,32	1,3	1,71	1,3	1,0
Valina	4,2	5,96	3,3	5,43	5,8	3,0
Cistina	2,0	-	-	-	0,1	-

O autor estudou também a aceitabilidade do alimento obtido de levedura como suplemento alimentar, sendo que em geral uma reação favorável é conseguida quando uma dieta regular é suplementada com 10 g/dia de levedura. Um ensaio de aceitabilidade com 300 pacientes de hospital, durante 191 dias, apresentou os resultados da Tabela 6, indicando o percentual a ser adicionado aos vários alimentos (47).

Tabela 6: Percentual de extrato de levedura adicionado aos alimentos.

Alimento	Extrato de Levedura Adicionada %
Sopas	12
Carne e peixe de panela	22
Temperos	25
Salada	16
Salada Temperada	83
Vegetais	14
Cereais	13
Ovos	18
Frita, cozida	21
Pudins	17
Assados	26

SERZEDELLO, A. em trabalho desenvolvido no Instituto Zimotécnico da USP, Piracicaba, 1962, cita que as proteínas constituem a parte nobre da alimentação do homem e dos animais. Os povos mais cultos e mais ativos são justamente grandes consumidores de proteínas, sobretudo proteínas ricas, ou seja, aquelas de origem animal. As regiões pobres deste planeta contrariamente, são constituídas por povos que não consomem proteínas suficientemente, formam os países chamados sub-desenvolvidos, alguns constituindo mesmo áreas de fome e penúria alimentar.

O problema do suprimento de proteínas no Brasil comporta ainda estudos, dada a heterogeneidade das condições existentes pela extensa área do território brasileiro. O consumo de proteína animal "per capita" ainda é baixo, por uma série de ra

zões ligadas quase todas ao custo da referida proteína, do nível cultural da população e do baixo poder aquisitivo.

Certas leveduras pertencem a classe de seres vivos capazes de realizar a síntese de proteínas, dispondo apenas de hidratos de carbono e sais minerais. Esta capacidade não está presente nem no homem, nem nos animais. Este fato pois, colabora para aumentar o valor destes microrganismos dada a possibilidade de indiretamente melhorarem o suprimento de proteína animal, como constituinte de rações.

A maioria das pesquisas realizadas em várias partes do mundo apontam as leveduras *Torulopsis utilis* (*Candida utilis*) como as que melhores resultados oferecem, continua o autor. São microrganismos poucos exigentes, que conseguem se multiplicar exuberantemente nas mais adversas condições e fornecem uma proteína protoplasmática de ótimo valor biológico, ao lado de apreciável riqueza em vitaminas do grupo B (192).

MENGATTI, L. em trabalho realizado no I.T.A.L., 1980, cita que a proteína de *C. utilis* é muito valiosa, com 70% de lisina disponível, como aminoácido sintetizado. Um bezerro pesando 100 kg pode sintetizar pouco menos que 0,45 kg de proteína/dia, enquanto que a mesma quantidade de levedura poderia produzir 50 toneladas de proteína no mesmo tempo, o que representa uma eficiência de 112.000 vezes mais do que o bezerro. Entre outras vantagens, a produção de proteína microbiana pode aproveitar como substrato um material que de outro modo seria descartado e/ou não rapidamente aproveitado.

Em seu trabalho, MENGATTI demonstra a necessidade de se conseguir alterar a composição de aminoácidos, baixar o conteúdo de ácidos nucleicos, eliminar componentes tóxicos ou alérgicos da parede celular ou substâncias que interfiram com a pa-

latabilidade do produto, através do desenvolvimento de mutantes. Também isolou mutantes de *C. utilis* (através de agentes mutagênicos) contendo biomassa proteica com elevado teor de metionina, visando a utilização dos mutantes para a suplementação proteica em alimentos. Os resultados comprovaram que o aumento de metionina em relação a linhagem original foi de 61,10% o que pode ser considerado um bom rendimento. O valor dessas leveduras no aproveitamento de resíduos de destilação se deve principalmente ao fato de assimilarem compostos como: Ácidos Orgânicos (fôrmico, acético, tartárico, cítrico, etc) aldeídos, aminoácidos, álcool, etc. e açúcares não aproveitáveis ou dificilmente aproveitáveis por levedura fermentativa (*Saccharomyces*), e que a concentração de açúcar no processo de aerobiose para o crescimento da levedura deve estar em torno de 1%. No suprimento de sais nitrogenados e fosfatados, a necessidade da *Torulopsis utilis* pode ser satisfeita por adição de fosfato de amônio na quantidade de 1 g/l de vinhoto e que durante o processo vegetativo pode ser feita a adição de NH_4OH toda vez que houver abaixamento do pH do meio (130).

LE FRANÇOIS, L. relata rendimento de 16 a 20 kg de levedura seca por hectolitro de álcool produzido, para vinhoto de melação de beterraba (106).

Diversos autores (9, 18, 46, 49, 54, 68, 98, 99, 100), confirmam que *Torulopsis utilis* (*Candida utilis*), são as que oferecem melhores resultados por serem organismos poucos exigentes e de rápido crescimento no aproveitamento do vinhoto como substrato.

MATSUO et alii citados por LE FRANÇOIS, observaram células de *C. utilis* em substrato de vinhoto contendo 1,6% de açúcar total, 1,2% de N total e 7,3% de matéria orgânica. A levedu

ra produzia 45% de proteína. Os mesmos autores obtiveram 50% de proteína de *C. utilis* e 45% de proteína de *C. arbonea* (107).

Segundo TAUK, S.M. as leveduras do gênero *Torulopsis* tem como composição química: água 5,85%; cinzas 9,07%; fósforo 1,92%; cálcio 0,85%; proteína 47,43%; gorduras 1,01 a 4,84% e fibra 0,82%. Além da composição química da massa celular verificou que, no vinhoto utilizado, as condições de cultivo para resultados satisfatórios são em pH 4,6 a 4,8, em 48 horas, e que os métodos e microrganismos que não exigem suplementação no vinhoto seriam mais acessíveis (212).

TAUK, S.M. estudando os efeitos do tratamento do vinhoto com ácidos minerais no desenvolvimento de *Candida utilis*, utilizou diversos tratamentos para verificar os seus efeitos na produção de biomassa, N total e P total. As culturas foram obtidas em meios de cultura contendo vinhoto, vinhoto suplementado com melação 3% e vinhoto previamente tratado com ácido nítrico, ácido sulfúrico e ácido clorídrico. A 30°C, agitação constante e após 30 horas de cultivo, determinou a eficiência de *C. utilis* quanto ao consumo de açúcar nos diversos meios contendo vinhoto. Os resultados mostraram que a utilização do vinhoto previamente tratado com ácido nítrico e suplementado com melação a 3% proporciona maior produção de massa seca, proteína bruta e fósforo total, não verificando diferenças significativas na utilização de açúcar do vinhoto, pela levedura. Este resíduo é de baixo custo e oferece condições para obtenção de proteína microbiana (213).

TAUK, S.M. estudou a adaptação de leveduras em vinhoto e vinhoto suplementado com melação 3%. Diferentes espécies do gênero *Candida* e *Torula* foram cultivadas. As leveduras desenvolveram em pH 4,6, 300 rpm, 30°C, em um ótimo crescimento foi ob-

tido em 30 horas, após vários estágios de crescimento, a levedura sofreu adaptação aos diferentes meios, sob as condições citadas (214).

TAUK, S.M. mostrou que algumas espécies de leveduras, *C. utilis*, *C. tropicalis* e *C. intermedia*, apresentam melhores condições de adaptação gradativa ao vinhoto (212).

TAUK, S.M. e GAMBALE, V. concluíram que o sucesso da produção de biomassa de levedura em vinhaça está relacionada com fatores de crescimento e depende da espécie utilizada, compararam a taxa de proteína e biomassa resultante de culturas puras ou mistas, na presença ou ausência de H_3PO_4 em vinhoto e verificaram que nem sempre a mesma levedura apresenta resultados satisfatórios quanto a produção de biomassa e proteína. *C. utilis* apresentou um maior teor de proteína, 45,74%, enquanto que *C. javanica* teve maiores teores de massa seca 5,5 g/l. e fósforo 1,87% e P_2O_5 4,28%. Quanto ao consumo de açúcar redutor não houve diferenças, o consumo variou entre 82,0 a 92,0% para as leveduras utilizadas. Os demais resultados indicaram que a adição de H_3PO_4 em vinhoto aumenta a produção de células e proteína em culturas mistas, dependendo das espécies nestas culturas. Os autores observaram melhor resultado de biomassa produzida para culturas de *C. solani* + *C. tropicalis* 1,89 g/l, sendo que para um maior teor de proteína a cultura de *C. brumpti* + *C. utilis* apresentou um resultado 9% maior (216).

LIMA, O.G. estudando *C. utilis* em vinhoto, considera que a quantidade de massa seca economicamente viável para a indústria seria de 11,1 g/l (114).

TAUK, S.M. estudando os efeitos da adição de sais e ácidos na produção de biomassa e proteína bruta descreve as con

dições nas quais a *Candida* cresceu em vinhoto. Agitação de 300 rpm, pH 4,6, tempo de cultivo de 24 h a 30°C. A maior produção de biomassa de *C. krusei* crescendo em vinhoto foi obtida com adição de 0,1% H_3PO_4 , e *C. guilliermondii* e *C. utilis* com adição de 0,002% de uréia mais 0,03% H_3PO_4 . O nível de 50% de proteína foi encontrado com *C. utilis* em vinhoto suplementado com 3% melão, 0,03% H_3PO_4 , 0,02% uréia e 0,05% $MgSO_4$. A adição de 0,05% $MgSO_4$ ao vinhoto decresceu a produção de biomassa de *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. stellatoidea*, *C. melinii* e *C. membranedefaciens*, mas aumentou para *C. utilis* e *C. tropicalis* (214).

Cita ainda NAWAWY, A.S. et alii que estudando comparativamente três leveduras *Candida utilis*, *Candida pelliculosa* e *Candida tropicalis* para a produção de biomassa proteica, em culturas a partir de melão, vinhoto e efluente de cervejaria, mostrou rendimentos de 62,5%, 67,2% e 60% com base no açúcar consumido. Em melão diluído com efluente de cervejaria houve rendimento similar com *C. utilis* e *C. pelliculosa*, enquanto que em vinhoto, a *C. tropicalis* rendeu 54,9% (214).

GAMBALE, V. em seu estudo com adição de K_2SO_4 em vinhoto para cultura de leveduras, conclui que em meio com vinhoto suplementado com quantidades crescentes de K_2SO_4 , este funciona como indutor na produção de biomassa e proteína em algumas leveduras (*C. macedoniensis*) quando adicionado em quantidades adequadas (0,30 a 0,60 g/l) (77).

ANGELIS, D.F. et alii estudando o crescimento de leveduras em vinhoto suplementado, empregando culturas puras e mistas, verificaram que quando se utiliza cultura mista há um aumento de biomassa e que das 90 culturas estudadas, 36 eram pu-

ras, as quais apenas 5,55% apresentaram valor superior a 5 g/l de célula seca, enquanto que das 54 mistas em 14,4% os valores da biomassa foram superiores a 5 g/l. Os resultados mostraram também que as culturas mistas consumiram mais matéria oxidável do que as culturas puras (8).

SOUSA, L.G. e LIMA, U.A. declararam que, de acordo com a literatura, as leveduras usadas principalmente para rações, com sua produção a partir do excesso de leveduras dos processos de fabricação do álcool, são as mais palatáveis, sendo as de melhor qualidade as obtidas em meios de resíduos de destilarias e de outros resíduos industriais. Utilizaram vinhoto para a obtenção de proteínas de cultura de *Candida tropicalis*, em vários meios de cultivo diferenciados. Glicose, melão e vinhoto em meios de cultura a vários pH foram utilizados, para estudar a influência de alguns nutrientes na fermentação, para determinar a concentração adequada de açúcares nos substratos de melão e para a produção de células. Observaram que o aparecimento de pseudo-micélio era prejudicial às operações de separação das células por centrifugação e que os meios mais pobres diminuíram a eficiência do desenvolvimento de *C. tropicalis*, mas ao mesmo tempo apresentavam vantagem industrial de não conduzir à formação do pseudo-micélio (201).

SALES, A.M. et alii estudaram a produção de biomassa proteica em melão com linhagens de levedura *Candida utilis* e *Rhodotorula gracilis* para produção de proteína monocelular. Verificaram que esse substrato suporta um bom crescimento dessas linhagens, apenas suplementado com fontes de nitrogênio e fósforo. Quando o meio de melão foi suplementado com ureia e fosfato de potássio, as linhagens de *C. utilis* e *R. gracilis* apresentaram rendimento em massa seca superior a 50% com teor de proteína de 50% (184, 185).

TOUZI, A. et alii selecionaram 15 cepas de leveduras para produção de levedura alimentar em substrato amiláceo. A levedura amilolítica *Schawanniomyces casteli* foi selecionada para este substrato, sendo este processo caracterizado por desenvolver-se em 2 etapas, trabalhando sob condições de baixa taxa de diluição. MORETON, R.S. (137) também usou uma cepa de *Candida utilis* para crescer em substrato de amido pré-hidrolizado quimicamente ou enzimaticamente. Nestas condições, a taxa de crescimento foi muito alta, porém o custo da etapa de pré-hidrólise no processo é um obstáculo importante economicamente (220).

PACA, J. comparou o crescimento característico da levedura *Candida utilis* obtido em estágio simples de um reator de fermentação multistágio, com alimentação simples e alimentação multifluxo de etanol. Etanol pode ser utilizado como única fonte de carbono e energia, somente sob condições aeróbicas. Testou o crescimento da levedura *C. utilis* e vários níveis de pressão de oxigênio. Os resultados obtidos para culturas contínuas em estado estacionário, trouxe evidências de que os dois tipos de suprimento de etanol e oxigênio afetam significativamente a taxa de crescimento da célula, a taxa de assimilação do etanol, a excreção de acetato no meio, o rendimento em biomassa e a produtividade (155).

MORESI, M. et alii, estudaram variáveis operacionais na produção de Single Cell Protein de *Candida utilis* em mosto de uvas em diferentes concentrações de substrato, valores de pH e suplementação de nutrientes, em frascos com agitação (shaker) pelo uso de uma combinação de experimentos predeterminada (135).

HERNANDEZ, E. et alii avaliando o crescimento de alguns microrganismos, leveduras e bactérias, em condições aeróbicas, discutiram o conceito de rendimento YATP (gramas de células

em peso seco, por moles de adenosina trifosfato sintetizada). O conceito de YATP foi discutido em relação ao rendimento sobre o oxigênio e a relação fósforo e oxigênio para bactéria, e reportada à relação de P e O para a levedura. Durante o crescimento aeróbico, parte da fonte de carbono é convertida em material celular, e parte é oxidada para produzir energia. A porção que é completamente oxidada é melhor estimada pela quantidade de oxigênio utilizada durante o crescimento (88).

OHNISHI, T. et alii relatou que a relação fósforo/oxigênio para NADP - ligado ao substrato (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato), é de 3 em mitocôndria de *C. utilis*. O rendimento em oxigênio obtido com *C. utilis* crescendo em glicose está em torno de 1,32 g de célula por grama de oxigênio. Tabela 8 (151).

Tabela 8: Rendimento em oxigênio de *Candida utilis* crescendo em diferentes fontes de carbono, sendo fonte de carbono um fator limitante.

Fonte de Carbono	Adição	Rend. em Fonte Carbono	Rend. em Observado	Oxigênio Calculado	Rendimento em Oxigênio	Tempo Geração (h)
Glicose		0,51	1,32	1,34	0,92	2,3
Glicose	Aminoácidos	-	1,35	-	1,56	1,0
Ac. Acético	-	0,36	0,70	0,62	0,43	2,3
Ac. Acético	Aminoácidos	-	0,81	-	0,94	1,6
Alc. Etílico	-	0,68	0,61	0,58	0,62	3,5
Alc. Etílico	Aminoácidos	-	0,90	-	1,35	1,8

Tabela 9: Valores de YATP para *Candida utilis* calculados para rendimentos em oxigênio e para relação P/O de 1, 2 e 3.

Fontes de Carbono	Adição	YATP		
		P/O = 1	P/O = 2	P/O = 3
Glicose	-	15,8	9,7	6,7
Glicose	Aminoácidos	16,2	10,0	6,8
Ac. Acético	-	11,2	6,4	4,1
Ac. Acético	Aminoácidos	12,9	7,4	4,7
Alc. Etílico	-	9,7	7,2	3,4
Alc. Etílico	Aminoácidos	14,4	7,65	5,1

De acordo com HEDENSKOG, G. et alii para a produção de concentrado proteico em larga escala, o processo de secagem em secador de tambor apresenta melhor valor nutricional da levedura, mas a alta extratividade de proteína e ácido nucléico somente é obtida após desintegração mecânica (87).

A produção de biomassa e a redução de carboidratos foi estudada por ADMASSU, W. et alii em processo de fermentação contínua em 2 estágios com alimentação simulada de rejeito de processamento de batata. A levedura amilolítica *Saccharomycopsis fibuligera* cresceu no 1º estágio e uma mistura de *S. fibuligera* e *C. utilis* foram usadas no 2º estágio. Todas as condições para o 1º e para o 2º estágios foram fixadas exceto a vazão do meio do 2º estágio. A máxima produção de biomassa ocorreu na taxa de diluição do 2º estágio, $D_2 = 0,27 \text{ h}^{-1}$; a redução de carboidratos foi inversamente proporcional a D_2 na faixa de 0,10 e $0,35 \text{ h}^{-1}$.

Conforme ADMASSU et alii, NISHIO, N. et alii usando meio composto de casca de laranja hidrolizada, detectou 56% de eficiência da utilização de açúcar redutor, e determinou o ren-

dimento do crescimento para consumo de açúcar redutor (g.g^{-1}) em *C. utilis* que foi de 0,48 (4).

Segundo os Anais do Simpósio sobre SCP, realizado em 1983 na Indonésia, a conclusão foi de que os microrganismos mais recomendáveis para aplicação em alimentação humana são *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida utilis*. A composição aproximada de leveduras para alimentação humana, e valores nutricionais são apresentados nas Tabelas 10 e 11.

Tabela 10: Composição aproximada de leveduras para alimentação humana.

Leveduras	Proteína (%)	Gordura (%)	Cinza (%)
<i>Candida utilis</i>	53	7,0	8,0
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	53	6,3	7,3

Tabela 11: Valores nutricionais das leveduras.

Leveduras	Valor Biológico	Digestibilidade	Utilização Líquida da Proteína
<i>Candida utilis</i>	32 - 48	85 - 88	27 - 42
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	52 - 87	70 - 90	36 - 78

Conforme (231).

TUSÉ, D. também afirma que as leveduras *C. utilis* são as mais utilizadas como fonte de proteína, corroborando com outros autores quanto as suas vantagens e desvantagens com relação a composição, valor biológico, etc. (222).

BORZANI, E. e VAIRO, M.L.R. desenvolveram um método simples para medida de fração de volume de células de leveduras em sedimento ou suspensão. Determinações mostram que sedimentos de células de leveduras de misturas de melaços completamente fermentados, levam a um valor de fração de volume afetado por um coeficiente de variação igual a 1,9% e a uma massa específica de células igual a 1,116 g.ml⁻¹. Quando o método foi aplicado a suspensão de células, o coeficiente de variação de volume de fração de células foi 2,9% e a massa específica 1,120 g.ml⁻¹ (22).

2.3. Bactérias Fixadoras de Nitrogênio

Bactérias Fixadoras de Nitrogênio de vida livre ou as simbióticas são amplamente distribuídas taxonomicamente, geográfica e ecologicamente.

KNOWLES, R. listou bactérias fixadoras de nitrogênio e os habitats onde foram observadas suas ocorrências. Dentre elas citou, em termos de metabolismo: aeróbicas, facultativas e anaeróbicas.

1) Aeróbicas - Azotobacteriaceae: *Azotobacter chroococcum*; *Azotobacter beijerinckii*; *Azotobacter vinelandii*; *Azotobacter paspali*; *Azomonas agilis*; *Az. insignis*; *Az. macrocytogenes*; *Beijerinckia indica*; *B. mebilis*; *B. fluminensis*, *B. derxii*; *Derxia gummosa*.

Coryneform: *Corynebacterium autotrophicum*; *Micobacterium flavum*.

Methylobacteria: *Methylococcus capsulatus*; *Methylomonas methanitricans* (sinônimo *Methylosinus trichosporium*) *Pseudomonas methanitricans*.

Spirillacea (Taxonomia incerta): *Spirillum lipoferum* (*Azospirillum* ?); *Aquaspirillum fasciculus*; *Aq. peregrinum*.

Chemolithotrophs: *Thiobacillus ferrooxidans*.

- 2) *Facultativas Anaeróbicas*: *Bacillaceae*: *Bacillus polymyxa*; *B. macerans*; *B. circulans*.

Enterobacteriaceae: *Citrobacter freundii*; *C. intermedius*; *Enterobacter aerogenes*; *E. cloacae*; *Erwinia herbiloca* (*Enterobacter agglomerans*); *Escherichia coli* (p/ manip. genética) *Klebsiella pneumoniae*; *K. rubiacearum*; *Carmonella typhimurium*.

Bactérias fototróficas: *Rhodopseudomonas capsulata*; *R. gelatinosa*; *R. palustris*; *R. sphaeroides*; *Rhodospirillum rubrum*; *Rhodomicrobium vanielli*.

- 3) *Anaeróbicas Obrigatórias*: *Bacillaceae*: *Clostridium butyricum*; *C. pasteurianum*; *C. acetobutylicum*; *Desulfotomaculum orientis*; *D. ruminis*.

- 4) *Afiliação incerta*: *Desulfovibrio desulfuricans*; *D. vulgaris*; *D. gigas*; *Methanobacterium omelianskii*.

- 5) *Sulfo-Bactérias Fototróficas*: *Chlorobium limicola*; *C. thio-sulfatophilum*; *Chromatium minutissimum*; *C. vinosum*; *Ectohorhodospira shaposhnikovii*.

Segundo o autor quanto aos sistemas de fixação de N_2 em relação às fontes de energia, a bactéria fixadora de nitrogênio heterotrófica depende direta ou indiretamente da fotossíntese da planta para seu suprimento de energia e carbono. A degradação de resíduos de plantas suporta assim fixadores de nitrogênio em muitos habitats nos quais a razão de carbono para nitrogênio é alta. Fixadoras de nitrogênio heterotróficas, presentes dentro ou perto de raízes de plantas, são consideravelmente vinculadas à fonte final fotossintética, sendo os organismos referidos como melhores, mais efetivos e eficientes em sua habilidade de fixar N_2 .

Comenta o autor que, quanto aos sistemas associados com a vida das plantas, as bactérias fixadoras de N_2 observadas dentro da região da raiz das plantas, inclui aeróbicas como *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Denxia* e *Spirillum*, facultativas anaeróbicas como *Bacillus*, *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Rhodopseudomonas*, e anaeróbicas obrigatórias como *Clostridium* e provavelmente *Desulfovibrium*. Esta bactéria deve estar presente em locais que diferem na disponibilidade de carbono orgânico e na intensidade da competição do microrganismo por este carbono. Assim elas devem colonizar a mucilagem da extremidade da raiz onde há um contínuo suprimento de polissacarídeos e casca de capa das células da raiz, assim como a mucilagem encontrada ao longo da raiz. Fora da raiz, fixadoras de N_2 estão presentes na rizosfera, a qual é a parte do solo influenciada pelas exudações e atividades metabólicas da raiz e na qual a viabilidade do carbono, oxigênio e nitrogênio combinado deve ser bem diferente daquela no corpo do solo. A raiz atua como fonte líquida de carbono orgânico, depósito de N_2 inorgânico, e também uma fonte ou depósito de oxigênio dependendo se o sistema é mais ou menos anaeróbico e saturado de água, ou anaeróbico e terrestre (102).

De acordo com DÖBEREINER, J. década de 70, a pesquisa em várias partes do mundo tropical revelou a existência de associações de bactérias fixadoras de nitrogênio com várias gramíneas forrageiras tropicais e cereais. A contribuição destas associações é muito variável mas pode atingir potencial substancial. O seu melhor aproveitamento se prende a interpretação e compreensão da sua natureza. Os primeiros resultados indicam papel importante das bactérias do gênero *Azotobacter paspali* em *Paspalum notatum* (61, 62).

DÖBEREINER, J. mostra que dados obtidos com o método de redução de acetileno com blocos intactos solo-planta, quando extrapolados tentativamente para valores por hectare, indicam fixação de até 400 gN/ha por dia em gramíneas forrageiras e trigo. A fixação de N_2 também pode ser determinada pela incorporação de nitrogênio molecular N_2 marcado com seu isótopo, peso $^{15}N_2$. Cita ainda que as gramíneas apesar das vantagens da fotossíntese mais eficiente, não possuem nódulos e não parecem possuir leg-hemoglobina ou outra substância semelhante, o que torna a fixação de N_2 muito mais variável e dependente de efeitos ambientais e climáticos. Isto não somente dificulta a avaliação da contribuição real destes sistemas, mas também limita a sua melhor exploração para a agricultura. A identificação das bactérias responsáveis pela fixação de N_2 requer a demonstração de interações planta bactéria que justifiquem a distinção entre um convívio ocasional e uma associação simbiótica (56).

Foram constatados em 1961, pelo autor, aumentos seletivos de bactérias do gênero *Beijerinckia* sob vegetação de cana de açúcar, especialmente da rizosfera desta planta (55). Também a ocorrência quase que exclusiva de *Azotobacter paspali* na rizos-

fera de *Paspalum notatum* (Gramma batatais) prova interações muito estreitas entre uma planta e uma bactéria fixadora de nitrogênio. Semelhantemente, isolinhas de trigo com substituição apenas de um par de genes, se tornaram seletivas para um *Bacillus* que fixa N_2 (63).

Segundo o mesmo autor, as características importantes para fixação de nitrogênio, ou simbiose planta-bactéria, são apresentadas a seguir (63):

1. Planta:

- 1.1. Conversão eficiente da energia solar.
- 1.2. Disponibilidade de excessos de produtos fotosintéticos.
- 1.3. Formação de nódulos ou estruturas correspondentes que oferecem: Proteção mecânica, acesso rápido ao oxigênio no sítio, via específica de assimilação de amônia capaz de assimilar concentrações muito baixas.

2. Bactérias:

- 2.1. Metabolismo oxidativo.
- 2.2. Mecanismo de reconhecimento da planta hospede.
- 2.3. Infecção das raízes e multiplicação interna.
- 2.4. Fixação de N_2 sem multiplicação de células.
- 2.5. Excreção do NH_3 fixado (de repressão da nitrogenase).
- 2.6. Mecanismos alternativos de proteção da nitrogenase contra oxigênio se a planta não oferece.

BECKING, J.H. estudando o gênero *Beijerinckia* que compreende uma bactéria fixadora de nitrogênio específica aeróbica, também conhecida como *Azotobacter indicum* conforme STARKEY R.L.

e DE, P.K. (204) encontrou este microrganismo em alguns solos de Bogor (Java, Indonésia) e propôs um novo nome de *Beijerinckia* para este, em vista das características culturais e diferenças morfológicas, que o distingue de outras espécies de *Azotobacter*. DERX, H.G. (52, 53) adicionou a este gênero novas espécies, *B. mobile* e uma variante, *B. indica*, var. *Alba*.

Em contraste à bactéria fixadora de nitrogênio do gênero *Azotobacter*, há pouca informação da distribuição dos representantes do gênero *Beijerinckia* em solos. A *Beijerinckia* foi relatada nas seguintes localidades: Índia, Burma, Malásia, Japão, Norte da Austrália, Costa do Marfim, Madagascar, Tangânicca, Suriname e Brasil (Rio de Janeiro). (17)

Segundo o autor, ambas as espécies, *Azotobacter* e *Beijerinckia*, crescem desde os 16°C, mas *Beijerinckia* não cresce além dos 37°C, enquanto que as cepas de *Azotobacter* cresceram além de 40°C até 45°C. Quanto a sobrevivência a baixas temperaturas, as cepas de *Beijerinckia* podem ser mantidas por período de 3 a 4 meses a temperatura de 10°C. Após 10 meses nesta temperatura, apenas poucas cepas cresceram sob condições normais, cresceram lentamente, ou produziram menos colônias, ou não cresceram, em placa com agar. Suspensão de *Azotobacter chroococcum* e *Azotobacter vinelandii* tratados da mesma maneira tiveram bom crescimento.

Em relação ao pH, continua o autor, é bem conhecido o fato de que a ocorrência de *Azotobacter* em solo requer um valor de pH de 6,0 ou mais. Em alguns casos anormais apenas, cepas de *Azotobacter* apresentam resistência a reações ácidas. Visto que a *Beijerinckia* tem sido frequentemente encontrada em solos ácidos, o autor estudou a relação entre a ocorrência de *Beijerinckia* e o pH do solo. As maiores percentagens da sua ocorrência

em solos foram em faixas de pH 5,5 a 5,9 (74,2%) e em 5,0 a 5,4 (64,3%). A valores altos e baixos de pH, um decréscimo gradual em percentagem da *Beijerinckia* em solos foi observado; abaixo de pH 4,0 e acima de pH 7,4, está inteiramente ausente. *Azotobacter* esteve ausente em todos os solos com pH abaixo de 6,0. A percentagem deste aumenta regularmente de pH 6,0 ao pH 7,5 e em todos com pH além de 7,5.

Em relação à nutrição mineral do gênero *Beijerinckia*, o autor afirma que traços do elemento molibdênio são essenciais para a fixação biológica de nitrogênio. O crescimento de *Beijerinckia* foi efetuado em meio básico, livre de nitrogênio, com a seguinte composição: água destilada p/1000 ml; glicose 20,0 g; K_2HPO_4 0,8 g; KH_2PO_4 0,2 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g; $FeCl_3 \cdot CH_2O$ 0,05 g; $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0,005 g; $ZnSO_4 \cdot 6H_2O$ 0,005 g; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,004 g e $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 0,005 g; pH 6,9.

O autor afirma também que as cepas de *Azotobacter* cresceram em um meio similar, mas o fosfato foi alterado para K_2HPO_4 0,1 g/l, e foi adicionado $CaCO_3$ 4,0 g/l, devido a muitas cepas exigirem cálcio para crescimento, além de elevar o pH a um valor ideal (17).

A influência de metais na fixação de nitrogênio foi bastante estudada por BECKING, J.H., testando Ca, Fe, Al, Ti, Mg, Mn, Mo, V, Cu, Zn, e também fosfato PO_4^{3-} (19).

JENSEN, H.L. estudou a influência do molibdênio, cálcio e agar na fixação por *Azotobacter indicum*, constatando que esta bactéria requer este elemento para a fixação, corroborando observações de outros autores, sendo que o efeito inicia a uma concentração de Mo de 0,0001 a 0,001 ppm, e a concentração ótima é de 0,1 a 1,0 ppm Mo (96).

Com relação à fixação de nitrogenio em *Azotobacter vi*

nelandii ALLISON, R.M. e BURRIS, R.H. aplicando N_2^{15} no estudo da cinética de fixação de N_2 , mostrou que dentre os produtos isolados de células e do meio, amida N ou amônia aumenta rapidamente em função da concentração de N_2^{15} . Quando a percentagem de N_2^{15} total encontrada em cada processo é plotada versus tempo, a amida N das células e a amônia do meio exibem inclinação negativa característica de produtos primários de fixação.

DALTON, H. estudando o efeito do oxigênio no crescimento de *Azotobacter chroococcum* em cultura contínua e batelada, relatam que as observações feitas sugerem dois mecanismos na célula para proteger os componentes de nitrogenases sensíveis ao oxigênio: aumento da respiração para eliminar o excesso de oxigênio e um estado conformacional da nitrogenase que previne danos pelo O_2 (48).

SENIOR, P.J. et alii estudaram a limitação de oxigênio na formação de poli-B-hidroxibutirato em cultivo em batelada e contínuo de *Azotobacter beijerinckii* e discutem em relação a formação deste composto. A eficiência de crescimento e rendimento do crescimento durante o crescimento em glicose, sugerindo que poli-B-hidroxibutirato é produzido em resposta à limitação de oxigênio e representa não apenas uma reserva de carbono e energia, mas também um escoadouro de elétron no qual o excesso de poder de redução pode ser canalizado. (191)

LEES, H. e POSTGATE, J.R., em cultura de *Azotobacter chroococcum*, mostraram uma relação inversa entre a formação de biomassa e a taxa de diluição, avaliada pelo aumento do conteúdo de polissacarídeo e poli-B-hidroxibutirato (111).

SUTO, T. isolou previamente uma cepa de *Azotobacter* spp ácido tolerante, de solo de cinza vulcânica ácida no Japão, aplicando a técnica de placa de solo. Pelas suas características, o

microrganismo foi identificado como *Azotobacter indicum*. Este distinguiu-se em vários aspectos de outras espécies de *Azotobacteriaceae* como *A. agile* e *A. chroococcum*, (seu pequeno tamanho, crescimento lento, produção vigorosa, e crescimento em meio ácido) (211).

Outro microrganismo também encontrado em solos de cana_uviais é a *Derxia* que de acordo com pesquisa de BECKING, J.H. é um organismo estritamente aeróbico, bastonete, 1,0 - 1,2 por 3,0 - 6,0 μm , ocorrendo isoladamente ou em pequenas cadeias, gram negativo, formando massa gelatinosa consistente, onde exige molibdênio para o processo de fixação de N. Apresenta catalase negativa, também crescendo e fixando nitrogênio sob pressão reduzida de oxigênio, é ácido tolerante, cresce lentamente a 15°C, apresentando ótimo crescimento entre 25-35°C, fraco a 40°C, não crescendo a 50°C. Espécie: *Derxia gummosa*. A eficiência de fixação de N₂ varia entre 9 a 25 mg N/g glicose consumida, que é notadamente menor do que com *Azotobacter* e *Beijerinckia*. Cresce desde pH 5,5 a pH 9,0 (18).

CAMPELO, A.B. e DÖBEREINER, J. estudaram *Derxia spp* quando da ocorrência em 100 amostras de solos dos estados de São Paulo (Matão), Rio de Janeiro (Km 47), Pernambuco (Petrolina) e Pará (Belém) com diversas plantas, predominando gramíneas. O meio de cultura usado para isolar a bactéria foi um agar com fonte de nitrogênio e com amido como fonte de energia, acrescentado de bicarbonato de sódio (Meio lipman).

Segundo os autores, *Derxia sp* foi encontrada em 36% do total de amostras, parecendo que o maior teor de umidade do solo favoreceu essa ocorrência. Assim 77% dos solos inundados, 36% de solos úmidos e apenas em 13% dos solos secos apresentaram esta bactéria. Sua ocorrência é mais frequente nas raízes (33%) do

que no solo mais afastado (26%). Ocorreu numa faixa de pH compreendida entre 4,5 e 6,5, sendo a ocorrência mais frequente (47%) entre 5,1 a 5,5 (36).

2.4. Cultura Mista

DOMMERGUES, Y. e MUTAFTSCHIEV, S. comentam pesquisas de fixação de nitrogênio apresentadas por vários autores, particularmente sobre *Azotobacter* e *Beijerinckia*, citando que não há referência ao desenvolvimento destes em presença de outros microrganismos, e sim sobre o seu desenvolvimento isolado e dentro do solo; comentam que devem ser analisados as interações antagônicas ou benéficas, que designaram como sinergismo.

Os autores apresentam resultados preliminares sobre uma associação sinérgica de dois microrganismos que coexistem muito frequentemente em solos tropicais, seguindo a mesma distribuição, para tanto usaram *Beijerinckia* e uma levedura.

Usaram *Beijerinckia* e *Lipomyces starkeyi* C79 e C81 (Tabelas 11 e 12).

Tabela 11: Experiência 1, resultados em mgN/60 ml meio.

Leveduras	Cultura de Levedura	Cultura para <i>Beijerinckia indica</i>	Cultura Mista Levedura + <i>B. indica</i>
C79	0,3	2,3	12,5
C81	0,5	1,5	12,3

Tabela 12: Experiência 2, duas cepas de *Beijerinckia fluminensis* com uma cepa de levedura *Lipomyces starkeyi* C79 - resultados em mgN/60 ml meio:

B.F.N.	Cultura Levedura Pura	Cultura B. <i>fluminensis</i> Pura	Cultura Mista Levedura + B. <i>fluminensis</i>
BFD	0,1	5,1	7,4
BF3	0,1	1,6	4,3

Na experiência 3, avaliaram a influência da presença ou não de filtrado de cultura da levedura *Lipomyces starkeyi* C79 na fixação de nitrogênio da cepa de *Beijerinckia indica* DSAI, (Tabela 13).

Tabela 13: Resultados da mgN/60 ml meio:

	Mistura Sem Filtrado	Mistura c/ Filtrado Não Concentrado	Mistura c/ Filtrado Concentrado
Fixação N ₂	7,2	7,9	8,8

Os autores concluem que a fixação de N₂ molecular por *Beijerinckia indica* e *Beijerinckia fluminensis* é muito aumentada se estas são cultivadas em presença de uma levedura oligonitrófica difundida nos solos tropicais (*Lipomyces starkeyi*) verificaram também a pequena influência do filtrado da levedura na fixação de N₂. (62)

3. CINÉTICAS DE CRESCIMENTO

Em processos fomentativos, principalmente em grande escala, o conhecimento da cinética destes torna-se importante, para que se possa melhor entendê-los bem como desenvolver possibilidades de otimização e simulação, visando simplificar e diminuir o acompanhamento experimental, PRADELLA, J.G.C. (166).

Encontramos dois tipos de modelos para a descrição da cinética de processos fermentativos:

1. Modelos Não Estruturados: Descrevem a cinética de maneira global para o crescimento celular, formação de produto e consumo de substrato.
2. Modelos Estruturados: Descrevem as mudanças dos componentes químicos intracelulares em função do tempo, relacionando-se com o crescimento celular, formação de produto e consumo de substrato.

Segundo o autor, os modelos não estruturados lançam mão de parâmetros globais de um sistema fermentativo, tais como, concentração celular, concentração de substrato e concentração de produto.

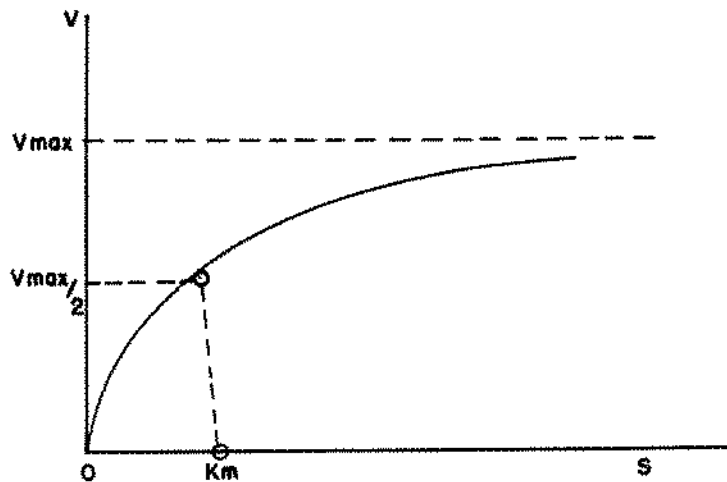
Alguns autores propõe relações matemáticas para descrever a cinética de um processo fermentativo (5, 50, 75, 76). Segundo eles o modelo cinético de MICHAELIS-MENTEN é adequado ao processo.

A equação a seguir é conhecida como equação de MICHAELIS-MENTEN, onde K_m é a constante de MICHAELIS e V_{max} é a velocidade máxima de formação do produto (corresponde à situação em que toda a enzima se encontra na forma de complexo, enzima e substrato), onde podemos calcular a velocidade de formação dos

produtos v , sendo S a concentração do substrato.

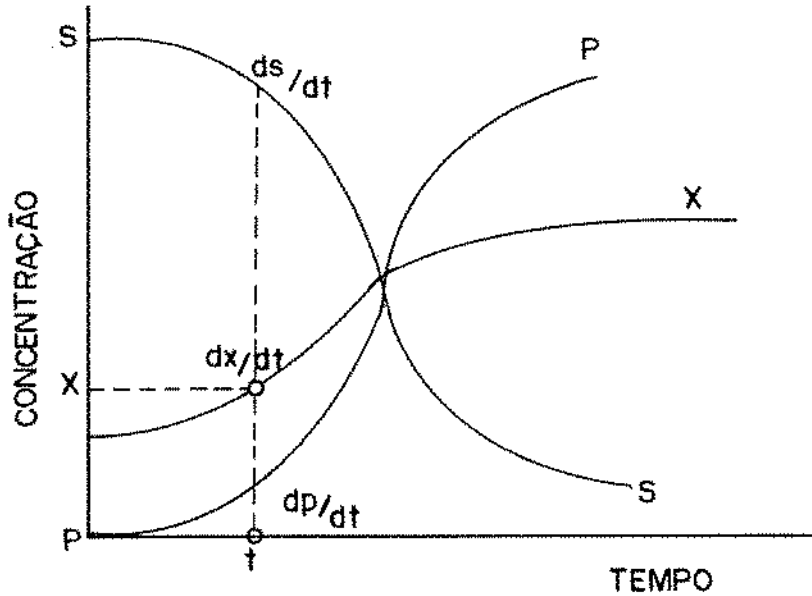
$$v = \frac{V_{\max} \cdot S}{K_m + S}$$

Figura 13: Representação da equação de MICHAELIS-MENTEN:



Continuando, os autores expõe que, considerando-se que entre os instantes t_1 e t_2 a concentração do agente de transformação (microrganismo) deve ter sofrido uma considerável variação, não faz sentido compararmos simplesmente as diversas velocidades nos respectivos instantes, pois podem ser o resultado de uma diferente concentração do agente de transformação. Procurou-se resolver o problema definindo-se Velocidade Específica.

Figura 14: Representação de um processo fermentativo:



a) Velocidade específica de crescimento do microrganismo:

$$\mu_X = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt}$$

b) Velocidade específica de formação do produto:

$$\mu_P = \frac{1}{X} \cdot \frac{dP}{dt}$$

c) Velocidade específica de consumo do substrato:

$$\mu_S = \frac{1}{X} \cdot \frac{dS}{dt}$$

Em um crescimento típico de microrganismo por processo descontínuo, destaca-se nitidamente uma fase exponencial de crescimento caracterizada por $\mu_X = \mu_{max} = \text{constante}$, (5. 76).

MONOD, J. (135), utilizando cultura pura de um microrganismo em meio com um único substrato limitante, apresenta a seguinte relação empírica para o crescimento:

$$\mu_X = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} = \mu_{max} \cdot \frac{S}{K_S + S} ,$$

onde μ_{max} é a velocidade específica máxima de crescimento quando a concentração do substrato é ilimitada, K_s é a concentração do substrato para a qual a velocidade específica de crescimento vale $\mu_{max}/2$, e μ_x a velocidade específica de crescimento.

MATERIAL E MÉTODOS

1. MICRORGANISMOS

1.1. Foram utilizados os seguintes microrganismos fixadores de nitrogênio:

Beijerinckia sp; B1059; B102; B5162; *Azotobacter paspali* AXINC-IB11662; A.P. 31; A.P. 20; *Azotobacter vinelandii*; *Derxia gummosa*.

As cepas foram cedidas pelo Departamento de Microbiologia de Solos do CENA-Piracicaba e do Centro Nacional de Biologia do Solo, EMBRAPA, Km 47, Rio de Janeiro.

1.2. A cepa de levedura *Candida utilis* foi cedida pelo Laboratório de Bioengenharia da F.E.A., UNICAMP, Campinas.

1.3. Os microrganismos foram mantidos em seus meios específicos nas condições adequadas.

2. MEIOS DE CULTURA

2.1. Os meios de cultura para manutenção dos microrganismos apresentam-se no Quadro 1.

Quadro 1: Composição dos meios de cultura sólidos

COMPONENTES (g/l)	MEIO I	MEIO II	MEIO III
K_2HPO_4	0,05	0,05	0,1
KH_2PO_4	0,15	0,15	0,4
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,02	0,02	0,02
$FeCl_3$	0,01	0,01	0,01
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2	0,2	0,2
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0,002	0,002	0,002
NaCl	-	-	-
$CaCO_3$	-	0,5	-
Sacarose	20	20	10
Extrato Levedura	-	-	0,4
Agar	15	15	15
Azul bromotimol (indicador)	0,25	0,25	-
pH	7,0	7,0	7,0

OBS.: O meio I para *Beijerinckia* sp; o meio II para *Azotobacter* sp; o meio III para *Derxia gummosa*.

- o pH foi ajustado antes de esterilizar a 121°C p/15 min. com NaOH 10N e inclinado.
- Os meios IA, IIA e IIIA são respectivamente os meios I, II e III com substituição de 50% da sacarose por quantidade proporcional de vinhoto, em peso.
- Os meios IB, IIB e IIIB são respectivamente os meios I, II e III com substituição total de sacarose por quantidade proporcional de vinhoto, em peso.

- Os meios de pre-fermentação V, VI e VII têm respectivamente as mesmas composições dos meios I, II e III sem o agar. Utilizou-se 100 ml em frascos de 500 ml, esterilizados da mesma forma.

2.2. Os meios líquidos para cultivo, usando composição com vinhoto estão apresentados no Quadro 2.

3. MATÉRIA PRIMA

A matéria prima utilizada para o preparo do substrato para fermentação, foi o vinhoto da Usina Costa Pinto em Piracicaba, SP, colhida a 98°C , transportada em butijões de plástico de 25 l para a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Departamento de Tecnologia de Alimentos, e mantida em freezer, -5 a -10°C , até sua utilização, por 6 meses aproximadamente.

O vinhoto foi clarificado da seguinte forma: após centrifugação a 3000 rpm, aproximadamente, por 30 min., foi colocado em frascos e esterilizados em autoclave a 121°C por 15 min.

A composição da 1ª partida foi analisada no Laboratório de Controle de Qualidade da Copersucar, Piracicaba, SP, DTAG-EECC-Sertãozinho.

A composição da 2ª partida foi analisada no Laboratório da FEEMA, Rio de Janeiro, RJ.

As demais análises durante as amostragens dos diversos experimentos em laboratório, foram realizados no Laboratório de Fermentação do DTA-UFRRJ, Laboratório de Solos do DS-IA-UFRRJ e Laboratório de Microbiologia de Solos-EMBRAPA. Algumas análises

Quadro 2: Composição dos meios líquidos para cultivo

COMPONENTES g/l	MEIO VIII	MEIO IX	MEIO X	MEIO XI	MEIO XII	MEIO XIII	MEIO XIV	MEIO XV	MEIO XVI
K_2HPO_4	0,05	0,05	0,1	0,05	0,05	0,1	-	-	-
KH_2PO_4	0,15	0,15	0,4	0,15	0,15	0,4	-	-	-
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	-	-	-
$FeCl_3$	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	-	-	-
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	-	-	-
Na_2MoO_4	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	-	-	-
NaCl	-	-	0,1	-	-	0,1	-	-	-
$CaCO_3$	-	0,5	-	-	0,5	-	-	-	-
Sacarose	20	20	10	20	20	10	-	-	-
Estr. Levedura	-	-	0,4	-	-	0,4	-	-	-
Volume (ml)	50	50	50	100	100	100	-	-	-
Vinhoto Clar. (ml)	50	50	50	100	100	100	100	100	100
$(NH_4)_2HPO_4$	-	-	-	-	-	-	-	1,0	-
Na_2HPO_4	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0
pH	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	7,0	*	*	*

* pH variável.

físico-químicas, nitrogênio orgânico e amoniacal, D.B.O.₅ e D.Q.O. foram realizadas no Laboratório da FEEMA, Rio de Janeiro.

4. METODOLOGIA

Procurou-se utilizar metodologia facilmente encontrada na literatura e os procedimentos mais comuns, devido ao objetivo deste trabalho ser a busca de um processo simples, visando a sua aplicação em escala industrial.

Inicialmente, procedeu-se aos testes preliminares, donde escolhemos duas cepas para o desenvolvimento do trabalho. Utilizou-se meios sólidos com vinhoto e foram observados os crescimentos de colônias na superfície dos tubos e placas. Os crescimentos foram avaliados com a marcação de 0, +, ++, +++, +++, até +++++.

4.1. Preparo do inóculo de *Beijerinckia sp* e *Azotobacter vinelandii*

Utilizou-se o meio V e o meio VI para o preparo do inóculo de *Beijerinckia sp* e *Azotobacter vinelandii* respectivamente. Foram colocados 100 ml de meio em frascos de erlenmeyers de 500 ml, utilizando-se suspensão de células preparada a partir de cultura em tubo inclinado com meios I e II respectivamente, ressuspensa em sol salina 0,85%, estéril, raspando a cultura com a própria pipeta estéril. Esta suspensão foi inoculada no frasco com o meio líquido para se preparar o inóculo, incubada em agitação até que se formasse uma suspensão consistente, com o aparecimento de uma goma, sinal do pleno crescimento, conforme ensaios pre

liminares, à temperatura ambiente, 25 a 30^o C, pH inicial 7,0, em agitador rotativo a 250 rpm por aproximadamente 60 horas.

Esta suspensão de consistência elevada, foi centrifugada a 3.000 rpm, em centrífuga marca International Equipment Co., e ressuspensa com solução salina 0,85% por duas vezes, com as precauções de esterilidade normais. Em seguida foram tomadas 3 alíquotas para leitura de densidade ótica, considerando-se um cálculo para diluição a partir dos valores obtidos em ensaios preliminares, ou seja, valor mínimo de 0,8 de D.O. (absorbância lida a 540 nm) em espectrofotômetro Spectronic 20.

$$V_1 \cdot DO_1 = V_2 \cdot DO_2$$

V_1 = volume do inóculo

DO_1 = densidade ótica do inóculo

V_2 = volume do substrato (100 ml aprox)

DO_2 = densidade ótica desejada

4.2. Preparo do inóculo de *Candida utilis*

Colocou-se 100 ml do meio de cultura XV esterilizado em frascos de erlenmeyers de 500 ml, inoculado com uma suspensão de células preparadas a partir de culturas em tubos com meio batata dextrose agar inclinado, ressuspensas com solução salina 0,85% estéril, raspando-se e homogeneizando-se com a própria pipeta estéril.

Após a inoculação da suspensão no frasco, este foi incubado em agitação durante aproximadamente 20 horas, à temperatura ambiente, 25-30^oC, pH inicial natural, em agitador rotativo a 250 rpm.

A suspensão obtida foi centrifugada, em frasco apropriado estéril, a 3.000 rpm durante 30 min. O procedimento de ressuspensão e centrifugação foi repetido por 2 vezes.

O material centrifugado foi novamente ressuspensão em sol. salina 0,85% estéril, e foram tomadas 3 alíquotas para leitura de densidade ótica, considerando-se 0,5 de absorbância à 540 nm, conforme procedimento citado, e do número de células em Câmara de Neubauer.

4.3. Condições de fermentação

O cultivo foi feito em frascos de erlenmeyers de 500 ml com 100 ml de meio específico para cada tratamento, em condições estéreis, mantidos sob agitação em agitador rotativo a 250 rpm, à temperatura ambiente, 25-30°C, sendo feitas amostragens de 6 em 6 horas, 12 em 12 horas ou 24 em 24 horas aproximadamente, e com pH inicial variável. Em cada amostragem foram feitas as determinações de nitrogênio total, densidade ótica da suspensão, número de células e pH.

4.4. Relação Peso Seco X Densidade Ótica

Foram feitas pesagens de cadinhos, secos previamente em estufa 85°C até peso constante, com volumes conhecidos de amostras, retiradas durante os cultivos e após secagem, até peso constante. Feita a diferença de peso e a média aritmética das repetições, os resultados foram transformados em g/l.

Após o cálculo da média aritmética da densidade ótica de cada repetição, tirou-se a relação peso seco/densidade ótica, média para cada tratamento.

4.5. Contagem de Células

O número de células de leveduras foi contado para cada amostragem, acompanhando-se o crescimento e a concentração celular ao longo dos experimentos, utilizando-se Câmara de Neubauer em microscópio.

4.6. Determinação de Nitrogênio Total

Foi utilizado o método de Microkjeldahl, (8) com o cálculo de nitrogênio em ppm:

$$N(\text{ppm}) = \text{Vac} \times \text{Nac} \times \text{mEqN}_2 \times 5 \times 200 \times 1000$$

Nppm = ppm de nitrogênio

Vac = volume de ácido utilizado na titulação

Nac = normalidade do ácido (titulado previamente)

mEqN₂ = miliequivalente grama do nitrogênio = 0,014 g

4.7. Determinação de D.B.O.₅; D.Q.O.; Nitrogênio; Análises Físico-Químicas

Foram feitas as determinações de D.B.O.₅, D.Q.O., (72, 73) nitrogênio orgânico, nitrogênio amoniacal, nitrogênio total e pH (8), pelo laboratório da FEEMA, Rio de Janeiro, utilizando metodologia padrão adotada pela instituição.

As amostras enviadas para análise, foram tomadas no início e no fim de cada tratamento, obtidos os valores médios para as repetições.

4.8. Métodos Matemáticos Utilizados

4.8.1. Cinética de Crescimento

Foi utilizado o método cinético de Kono, T. Asai, (103) para o crescimento celular supondo-se que este se dá em 3 fases: transiente, exponencial e declínio, sendo consideradas as fases exponencial e declínio. Foram determinados os seguintes parâmetros descritos a seguir:

1 - Fase exponencial, entre os tempos t_1 e t_c :

$$\bar{X} = \bar{X}_c \cdot \text{Exp} \left[K_{\bar{X}} \cdot (t - t_c) \right]$$

2 - Fase declínio, em tempos além de t_c :

$$\bar{X} = \bar{X}_m (\bar{X}_m - \bar{X}_c) - \text{Exp} \left[- K_{\bar{X}} \cdot \frac{\bar{X}_c}{\bar{X}_m - \bar{X}_c} \cdot (t - t_c) \right]$$

\bar{X} = Conc. celular média

\bar{X}_0 = Conc. celular média inicial

\bar{X}_1 = Conc. celular média no início fase logarítmica

\bar{X}_c = Conc. celular média no início fase declínio

\bar{X}_m = Conc. celular média no final fase declínio

t = Tempo

t_0 = Tempo fase inicial

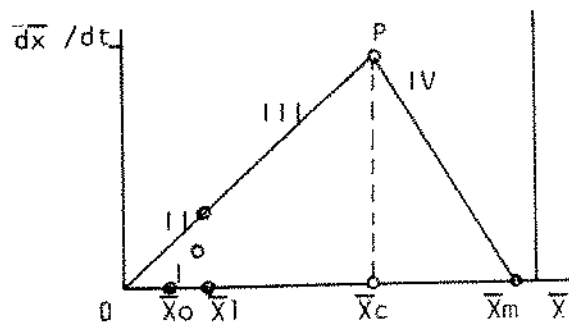
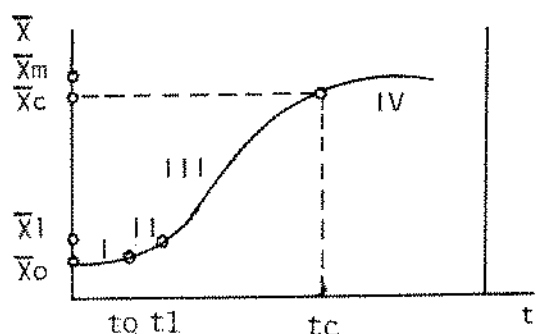
t_1 = Tempo início fase logarítmica

t_c = Tempo início fase declínio

$K_{\bar{X}}$ = Coeficiente angular fase logarítmica = velocidade específica de crescimento.

A estimativa dos diversos parâmetros cinéticos de crescimento, \bar{X}_0 , \bar{X}_1 , \bar{X}_c , \bar{X}_m , t_0 , t_1 , t_c , t_m e $K_{\bar{X}}$, foi feita seguindo os seguintes procedimentos:

- Plotou-se em papel gráfico milimetrado as médias das concentrações celulares x tempo.
- Traçaram-se curvas pelos respectivos pontos médios.
- Determinou-se graficamente as derivadas dx/dt para os respectivos intervalos de tempo.
- Plotou-se valores de \bar{X} em abscissa de dx/dt em ordenada, para os respectivos intervalos de tempo, utilizando-se papel milimetrado.
- Pela interseção das curvas formada por estes pontos são obtidos os valores de \bar{X}_0 , \bar{X}_1 , \bar{X}_c , \bar{X}_m , t_0 , t_1 , t_c , e $K_{\bar{X}}$ dado pela tangente da reta \overline{OP} .



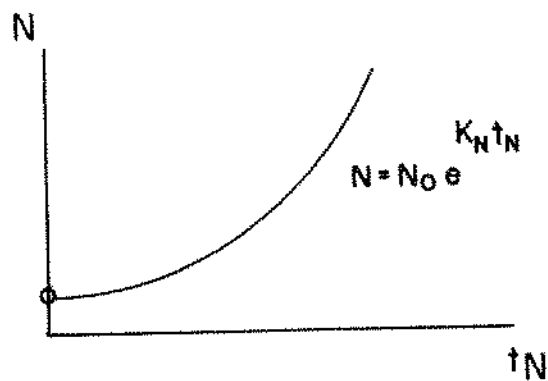
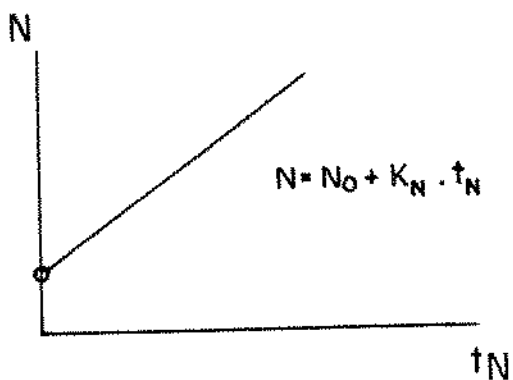
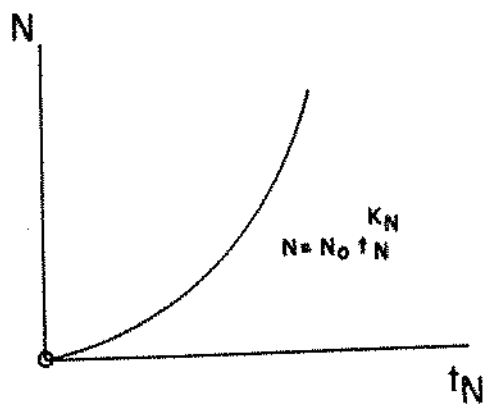
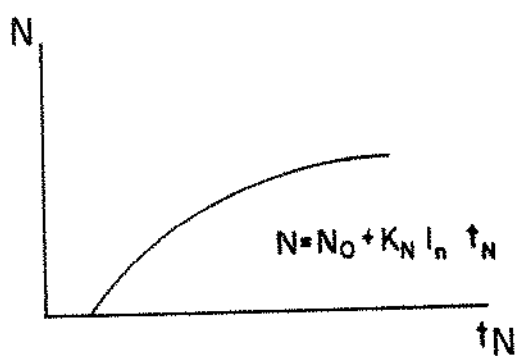
56

4.8.2. Cinética do Acúmulo do Nitrogênio

A variação da concentração do nitrogênio total foi considerada a partir dos valores experimentais, calculando-se a regressão e escolhendo-se o coeficiente de determinação do modelo

que permitiu a maior aproximação possível, dentre os modelos linear, logarítmico, exponencial e de potência, utilizando-se programas de regressão da calculadora HP-41C.

A partir da construção da curva calculada, considerando-se o melhor modelo, calculou-se a constante K_N ; fixando-se os valores de t_N e N_0 .



4.8.3. Análises Estatísticas

Foram feitas análises estatísticas dos diversos experimentos, visando observar os dados mais significativos, para confirmar os objetivos propostos por este trabalho. O desvio padrão foi determinado, sendo feitas análises de variância, de acordo com GOMES, F.P. (83), CONAGIN, A. (45), realizadas em microcomputador do setor de métodos quantitativos - CNPMS - EMBRAPA-RJ, programa "Sistanva" do "Centro Nacional de Sorgo e Trigo, EMBRAPA-Sete Lagoas-MG".

RESULTADOS

O Quadro 1 mostra o resultado do ensaio qualitativo do crescimento das B.F.N. em vinhoto.

As Figuras 1, 2, 3 e 4 mostram os resultados do crescimento de *Beijerinckia sp* em meios I, VIII, XI e XIV, respectivamente.

As Figuras 5, 6, 7 e 8, mostram os resultados do crescimento de *Azotobacter vinelandii* em meios II, IX, XII e XIV, respectivamente.

A Figura 9 mostra o ensaio de crescimento de *C. utilis* em vinhoto clarificado, pH inicial 4,6 em meios XV e XVI, em termos de peso seco e nitrogênio total da suspensão e do sobrenadante.

As Figuras 10 e 11 mostram o crescimento de *C. utilis* pH inicial 4,6, em meios XV e XVI, em termos de número de células, nitrogênio total da suspensão e do sobrenadante e pH no meio XV.

A Figura 12 mostra o pH da suspensão e do sobrenadante de *C. utilis* no meio XVI.

A Figura 13, mostra o crescimento simultâneo de *C. utilis* e *A. vinelandii* inoculados no mesmo instante e após 12 horas, em meios XV, padrão e XVI, em pH inicial 4,6, em termos de número de células e nitrogênio total.

As Figuras 14, 15 e 16 mostram o crescimento de *C. utilis* e *A. vinelandii*, inoculados simultaneamente em meio XVI e *C. utilis* em meio XV como padrão e *C. utilis* em meio XVI, em termos de peso seco da suspensão, número de células, nitrogênio total da suspensão e do sobrenadante, em pH natural do vinhoto clarificado.

As Figuras 17, 18 e 19 mostram o crescimento de *C. utilis* e *A. vinelandii* inoculados simultaneamente em meio XVI, *C. utilis* em meio padrão XV e *C. utilis* em meio XVI, em termos de peso seco, número de células, nitrogênio total da suspensão e do sobrenadante em pH inicial 6,0.

As Figuras 20, 21, 22 e 23 mostram o crescimento de *C. utilis* e *Beijerinckia sp*, inoculados simultaneamente em meio XVI, *C. utilis* em meio padrão XV e *C. utilis* em meio XVI, em termos de peso seco da suspensão, número de células, nitrogênio total da suspensão e do sobrenadante e variação do pH, em pH inicial 6,0.

O Quadro 2 mostra D.B.O., D.Q.O. e nitrogênio orgânico dos sobrenadantes inicial e final dos tratamentos.

O experimento cujos resultados correspondem às Figuras de 17 a 23 e ao Quadro 2, foi tomado como significativo para o cálculo dos parâmetros cinéticos adiante.

As Figuras 24, 25 e 26 mostram o crescimento de *C. utilis* e *Beijerinckia sp* inoculados simultaneamente em meio XVI, *C. utilis* em meio padrão XV e *C. utilis* em meio XVI, em vinhoto da segunda partida, colhido na mesma usina, em termos de peso seco

da suspensão, número de células, nitrogênio total da suspensão e do sobrenadante, em pH inicial 6,0.

O Quadro 3 mostra D.B.O., D.Q.O., nitrogênio total, nitrogênio orgânico e amoniacal e pH, dos sobrenadantes inicial e final dos tratamentos.

As Figuras 27, 28 e 29 mostram o crescimento de *C. utilis* e *Beijerinckia sp* inoculados simultaneamente em meio XVI, *C. utilis* em meio padrão XV e *C. utilis* em meio XVI, em vinhoto da segunda partida, em termos de peso seco da suspensão, número de células, nitrogênio total da suspensão e do sobrenadante em pH inicial 6,5.

O Quadro 4 mostra D.B.O., D.Q.O., nitrogênio total, nitrogênio orgânico e amoniacal e pH, dos sobrenadantes inicial e final dos tratamentos.

Os Quadros 5 e 6 mostram os valores experimentais e os coeficientes de regressão das curvas calculadas a partir destes, para o cálculo dos parâmetros cinéticos do experimento tomado como significativo, citado anteriormente. O Quadro 7 mostra os pontos calculados das curvas de peso seco e número de células. O Quadro 8 mostra os pontos calculados das curvas de nitrogênio total.

As Figuras 30 e 33 mostram as curvas calculadas, utilizadas para cálculo dos parâmetros X_0 , X_1 , X_c , X_m , e de K_x , t_0 , t_1 , t_c e t_m , respectivamente para peso seco de células.

O Quadro 10 mostra as equações cinéticas propostas preliminarmente, para estimativa das curvas de crescimento do experimento de crescimento simultâneo de *Beijerinckia sp* e *C. utilis* no meio padrão XV, e no meio limitante em nitrogênio, XVI.

A Figura 31 mostra a curva calculada para número de células.

A Figura 32 mostra a curva calculada para nitrogênio total, utilizado para o cálculo de K_n e X_n nos três tratamentos.

A Figura 34 mostra a configuração espacial das curvas de peso seco, número de células e nitrogênio total, do experimento de *C. utilis* e *Beijerinckia* sp em pH inicial 6,0, para os 3 tratamentos utilizados.

DISCUSSÃO

Foi feita inicialmente a escolha das cepas de Bactérias Fixadoras de Nitrogênio (BFN) levando-se em conta características que preenchessem as condições dos experimentos, tendo o vinhoto como substrato. Em seguida foi realizado um ensaio qualitativo em meio sólido com substituição de 50% do açúcar, proporcionalmente, pelo vinhoto, observando-se em termos visuais o desenvolvimento das colônias em sua superfície, Quadro 1.

As cepas que alcançaram melhores crescimentos foram *Beijerinckia sp* (CENA), *Azotobacter vinelandii* (CENA) e a *Derxia gummosa* (CENA). *D. gummosa* foi descartada por apresentar dificuldades no manuseio e no crescimento em meio líquido.

Os resultados dos experimentos com *Beijerinckia sp* nos meios XI, e XIV, Figuras 3 e 4, mostrou que esta é capaz de crescer em substrato com vinhoto, aumentando sua massa celular 7,35 vezes em vinhoto puro, bem como o nitrogênio total da suspensão em 41% no mesmo meio, em aproximadamente 72 horas.

As Figuras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 ilustram os resultados, em termos de crescimento e aumento do nitrogênio total, estando de acordo com consulta feita pessoalmente à Dra. Alaides

P. Ruschell e a Dra. Maria José A. Sampaio (CENA - Piracicaba), que informaram que as B.F.N. não conseguem fixar N_2 em substratos com concentrações de nitrogênio mineral acima de 30 ppm, não ocorrendo a indução da enzima nitrogenase responsável pela metabolização do N_2 atmosférico.

Neste sentido as análises feitas pela FEEMA, RJ, mostram que o nitrogênio inorgânico do vinhoto utilizado não excedeu a 20 ppm. Conforme Quadros 2, 3 e 4.

Os resultados do crescimento de *Azotobacter vinelandii* nos meios de cultura XII e XIV mostraram semelhanças no comportamento desta em relação à *Beijerinckia* sp em vinhoto, apenas apresentando crescimento mais rápido, alcançando 9 vezes o seu peso inicial em 46 horas, não havendo diferenças significativas em relação ao aumento do nitrogênio, com cerca de 44% em 58 horas, conforme mostram Figuras 5, 6, 7 e 8.

1. CRESCIMENTO DE *C. utilis*

Os resultados iniciais dos testes realizados para a verificação da concentração adequada de $(NH_4)_2HPO_4$ e Na_2HPO_4 , para a suplementação do vinhoto na formulação dos meios XV e XVI respectivamente, mostraram que a concentração ideal foi de 0,1% no vinhoto clarificado, a qual passou a ser utilizada em todos os experimentos.

A Figura 9 mostra a diferença do crescimento de *C. uti*lis nos meios XV, padrão, e XVI, limitante em nitrogênio, em termos de peso seco e do nitrogênio total da suspensão no meio XVI, e sobrenadante em um ponto.

As Figuras 10 e 11 mostram a diferença do crescimento da *C. utilis* nos meios XV, padrão, e XVI, limitante em nitrogê-

nio, confirmando as previsões. Pode-se observar que houve uma redução de aproximadamente 50% da concentração inicial do nitrogênio total, com as análises feitas no sobrenadante após 18 horas de crescimento em meio XVI, Figura 11, e de aproximadamente 65% no meio XV, Figura 10.

A Figura 12 mostra que não há diferenças significativas na variação do pH da suspensão e do sobrenadante, chegando a 6,3 em aproximadamente 30 horas. No meio XV, padrão, o pH chegou a 6,7 em 36 horas aproximadamente.

A Figura 13 mostra que no crescimento simultâneo de *C. utilis* e *A. vinelandii* não ocorreu variação significativa no crescimento das culturas inoculadas simultaneamente ou com a inoculação do *A. vinelandii* após 12 horas de crescimento da *C. utilis*, no meio XVI. Uma vez, que não foram observadas diferenças significativas entre os dois crescimentos, passou-se a utilizar a inoculação simultânea dos dois microrganismos para efeitos de facilidade de manuseio, bem como ajuste de técnica para os experimentos subsequentes.

2. CRESCIMENTO SIMULTÂNEO DE *C. utilis* E B.F.N.

Foram realizados experimentos para a observação do crescimento da cultura mista de *C. utilis* e *A. vinelandii* em contraste com o crescimento de *C. utilis* em vinhoto clarificado em diferentes valores de pH inicial, seguindo os procedimentos desenvolvidos até aqui, com o objetivo de comparar os efeitos da cultura de levedura em meio padrão, em meio limitante em nitrogênio, com a cultura mista no meio limitante em nitrogênio e observar o sinergismo entre as B.F.N. e as leveduras.

As Figuras 14 e 15 mostram que houve aumento significativo em termos de peso seco de células bem como do número total de células, de aproximadamente 27% em 36 horas de crescimento em meio XVI, limitante em nitrogênio, comparando-se a cultura mista com a cultura pura, em pH inicial, natural do vinhoto após clarificado, de 4,15. O aumento do pH mostrou-se também significativo em favor da cultura mista, comparativamente com a cultura pura, apresentando uma diferença de aproximadamente 7% no pH final.

As Figuras 17 e 18 mostram os resultados do mesmo experimento anterior, em crescimento em meio XVI, porém com pH inicial ajustado para 6,0 com o objetivo de observar se um pH mais adequado ao *A. vinelandii* promoveria diferenças no resultado final do crescimento, utilizando-se a mesma técnica. Os resultados mostraram que as culturas tiveram seus maiores pesos secos de células a partir de 48 horas, com uma diferença de crescimento em favor da cultura mista de aproximadamente 78% se comparado com a cultura pura da levedura no mesmo meio limitante em nitrogênio. Em termos de número total de células, mostraram uma diferença de 50% em 96 horas em favor da cultura mista. O valor do pH final mostrou-se como esperado, chegando a de 8,20 a 8,80 respectivamente.

Como este pH inicial e as condições de cultivo mostraram-se satisfatórias, pelos resultados alcançados, passou-se então ao crescimento da cultura mista com *Beijerinckia sp*, nas mesmas condições, visto as dificuldades e desvantagens apresentadas pelo manuseio com a cultura de *A. vinelandii*.

As Figuras 20, 21 e 23 mostram os resultados do crescimento de *C. utilis* com *Beijerinckia sp* em meio XVI, em pH inicial 6,0. Houve aumento significativo em termos de peso seco de células, de aproximadamente 40% em 36 horas, em favor da cultura

mista, comparativamente com a cultura pura de levedura, caindo para aproximadamente 15% após 60 horas. Houve também aumento significativo do número de células total, de 65% a partir de 12 horas de cultivo, aumentando até 85% em 48 horas. O pH aumentou para 7.5 a 8.2 em aproximadamente 60 horas, para os três tratamentos.

As Figuras 24 e 25 mostram os resultados da repetição do experimento anterior em meios XV, XVI, porém utilizando-se de outra partida de vinhoto, coletado na mesma usina, porém em outro período, procurando-se observar possíveis diferenças ocasionais por uma matéria prima que pudesse ter a sua composição diferente.

Os resultados confirmaram o comportamento do experimento anterior (Figuras 20, 21 e 23) em meios com o vinhoto da 1ª partida e pH inicial 6,0, com o aumento do peso seco de células em 15% a partir de 24 horas, até 30% aproximadamente, em 72 horas, em favor da cultura mista, com amostragens a cada 24 horas. O aumento do número de células total mostrou-se também significativo, com 56% aproximadamente a partir de 24 horas até 85% aproximadamente em 48 horas, caindo até 10% em 96 horas. O pH aumentou semelhantemente ao experimento anterior, atingindo de 8,0 a 8,5 nos 3 tratamentos em aproximadamente 72 horas.

As Figuras 27 e 28 mostram o mesmo experimento, utilizando-se do vinhoto da outra partida na formulação dos meios XV e XVI, porém com o pH inicial ajustado para 6,5, visando observar-se possíveis alterações no crescimento das culturas em pH inicial mais elevado.

Os resultados mostram semelhanças de comportamento em relação aos experimentos anteriores. O peso seco de células teve aumento significativo de 30% aproximadamente, a partir de 7

horas, até 60% aproximadamente em 45 horas, em favor da cultura mista, com amostragens a cada 12 horas. O número de células total também apresentou aumento significativo em favor do crescimento misto com 23% aproximadamente a partir de 16 horas, até 55% aproximadamente em 53 horas. O pH também aumentou da maneira esperada, chegando a de 7,55 a 8,10 nos 3 tratamentos, em aproximadamente 40 horas.

3. AUMENTO DO NITROGÊNIO

As Figuras 4 e 8 mostram os testes iniciais de crescimento de *Beijerinckia sp* e *A. vinelandii* sendo que estas fixam nitrogênio em substrato com vinhoto, meio XIV, atingindo aproximadamente 41% de aumento do nitrogênio total da suspensão para *Beijerinckia sp* e 45% para o *A. vinelandii*, em pH inicial 7,0.

Foi feito um teste para se observar se o instante da inoculação da B.F.N. e da levedura em cultura mista influenciaria o aumento do nitrogênio. O resultado do crescimento mostrou que não houve diferença significativa entre o aumento do nitrogênio total da cultura inoculada simultaneamente, com o *A. vinelandii* e com *C. utilis*, ou com inoculação de *A. vinelandii* 12 horas após a inoculação da *C. utilis*, Figura 13. Foi utilizado o meio XVI com pH inicial 4,6 com amostragens a cada 6 horas, durante 30 horas de crescimento.

A Figura 16 mostra os resultados do crescimento de *C. utilis* e *C. utilis* com *A. vinelandii* em meios XV e XVI, pH inicial 4,35, acusando um aumento significativo do nitrogênio total da suspensão de aproximadamente 17% em 40 horas de crescimento, em favor da cultura mista, com amostragens a cada 12 horas.

A Figura 19 mostra a repetição do experimento anterior, com a confirmação dos resultados anteriores com o aumento significativo do nitrogênio total da suspensão, em favor da cultura mista, de 16% a partir de 48 horas, a aproximadamente 20% em 90 horas, com amostragens a cada 24 horas.

A Figura 22 mostra os resultados do crescimento de *C. utilis* e *C. utilis* com *Beijerinckia sp* em meio XVI, pH inicial 6,0, em condições semelhantes ao experimento anterior, com o aumento significativo do nitrogênio total da suspensão alcançando aproximadamente 47% em 60 horas em favor da cultura mista, com amostragens de 12 em 12 horas.

A Figura 26 mostra aumento significativo do nitrogênio total de aproximadamente 42% em 96 horas de crescimento em favor da cultura mista, com amostragens de 24 em 24 horas.

A Figura 29 mostra os resultados do crescimento de *C. utilis* e *C. utilis* com *Beijerinckia sp*, idêntico ao experimento anterior, porém com um pH inicial 6,5 e com aumento significativo do nitrogênio total da suspensão, alcançando aproximadamente 32% em 43 horas de crescimento, com amostragens a cada 12 horas.

4. REDUÇÃO DA D.B.O. E DA D.Q.O.

A avaliação da redução da D.B.O. e da D.Q.O. foi feita apenas nos últimos 3 experimentos, ou seja, nos crescimentos com *C. utilis* e *Beijerinckia sp*, quando se optou por esta cultura mista por permitir a homogeneização da biomassa produzida, facilitando operações como pipetagem, centrifugação e outras, propiciando assim vantagens em termos de manuseio e repetitividade, com uma melhor representatividade dos resultados.

Os resultados apresentados pela FEEMA no Quadro 2 mostram que houve uma redução significativa da D.B.O. em 73% aproximadamente no meio XV, padrão, com *C. utilis*, e no meio XVI, limitante em nitrogênio, com *C. utilis* e *Beijerinckia sp* contra uma redução de 50% aproximadamente no meio XVI, com *C. utilis* pura, em pH inicial 6.0.

A D.Q.O. reduziu 74% aproximadamente no crescimento de *C. utilis* em meio XV, padrão, 76% aproximadamente no crescimento misto em meio XVI, limitante em N, contra 44% aproximadamente no crescimento de *C. utilis* pura no meio XVI limitante em N.

O nitrogênio orgânico reduziu 96% no crescimento misto, contra 91% nos crescimentos da levedura pura nos meios XV e XVI.

Na repetição do experimento anterior com o vinhoto de outra partida em pH inicial 6,0, os resultados apresentados pela FEEMA no Quadro 3 mostram que houve uma redução da D.B.O. de 67% aproximadamente no crescimento de *C. utilis* meio XV, padrão, de 75% aproximadamente no crescimento misto em meio XVI, limitante em N e de 61% aproximadamente no crescimento da levedura pura em meio XVI, limitante em N.

A D.Q.O. reduziu 75% aproximadamente no meio XV, padrão, com o crescimento de *C. utilis* pura, 70% aproximadamente no meio XVI, com crescimento misto de *C. utilis* e *Beijerinckia sp*, e 68% aproximadamente no crescimento de *C. utilis* no meio XVI.

O Quadro 4, com os resultados apresentados pela FEEMA do crescimento com o vinhoto de outra partida, de *C. utilis* e *C. utilis* e *Beijerinckia sp*, em pH inicial 6.5, mostra que houve redução de 63% da D.B.O. no crescimento da levedura pura em meio XV, padrão, contra 55% nos crescimentos mistos e da levedura pura em meio XVI, limitante em nitrogênio.

A D.Q.O. reduziu 65% aproximadamente, com o crescimento de *C. utilis* em meio XV, contra 51% aproximadamente no cresci

mento de *C. utilis* e *Beijerinckia sp*, e 43% aproximadamente no crescimento de *C. utilis* pura, ambos em meio XVI.

5. PARÂMETROS CINÉTICOS

Os Quadros 5 e 6 mostram os resultados experimentais e os coeficientes das curvas para peso seco, número de células total e nitrogênio total, do experimento escolhido para o cálculo de equações cinéticas, ou seja, aquele mais representativo para demonstrar este tipo de crescimento misto. Neste experimento, onde foram crescidas a *C. utilis* em meio XV, a *C. utilis* com a *Beijerinckia sp* e a *C. utilis*, ambas em meio XVI, as curvas de peso seco e de número de células seguem o modelo logarítmico. As curvas de nitrogênio, dos crescimentos da *C. utilis*, seguem o modelo linear e a curva da cultura mista, de *C. utilis* e *Beijerinckia sp*, segue um modelo exponencial para o aumento do nitrogênio total da suspensão.

O Quadro 7 mostra os pontos das curvas de peso seco, \bar{X} e $d\bar{X}/dt$, para os três tratamentos, calculados de acordo com os modelos do Quadro 6, e do número de células, \bar{X}_c e $d\bar{X}_c/dt$, para os mesmos intervalos de tempo.

O Quadro 8 mostra os pontos das curvas de nitrogênio total calculados de acordo com os modelos do Quadro 6, para os três tratamentos.

O Quadro 9 mostra os parâmetros cinéticos calculados a partir das curvas traçadas pelos pontos dos Quadros 7 e 8.

O Quadro 10 mostra as equações cinéticas propostas, a partir dos parâmetros calculados para peso seco e nitrogênio total, deste experimento escolhido como representativo.

Meios	Cepas	Placa	Tubos
I	B. 105a	+++	+++
	B. 5162	++	+++
	B. 102	+	0
	B. Flum.	0	0
	B. sp (CENA)	++++	++++
II	AP. AXINCI3	+++	+++
	AP. 31	+++	+++
	AP. 30	++	++
	AP. 20	++	++
	A. vinelandii (CENA)	++++	++++
III	D. gummosa (EMBRAPA)	0	0
	D. gummosa (CENA)	+++	+++

Meios	Cepas	1a. Esterilização	2a. Esterilização
IA	B. 105a	++	++
	B. 5162	+	+
	B. 102	0	0
	B. Flum.	0	0
	B. sp (CENA)	+++	++
IIA	AP. AXINC (3/6662)	+++	+
	AP. 31	0	+
	AP. 20	+	+
	A. vinelandii	+++	++
IIIA	D. gummosa (EMBRAPA)	0	0
	D. gummosa (CENA)	+	0
IB	B. 105a	+	0
	B. 5162	+	0
	B. 102	0	0
	B. Flum.	0	0
	B. sp (CENA)	++	+
IIB	AP. AXINCI3/6662	++	+
	AP. 31	0	0
	AP. 20	0	+
	Av. vinelandii (CENA)	+++	+
IIIB	D. gummosa (EMBRAPA)	0	0
	D. gummosa (CENA)	+	0

Quadro 1: Teste qualitativo de crescimento em meios contendo vi-
nhoto para a seleção preliminar das B.F.N., na tempe-
ratura ambiente, (25-30°C), após 4 dias de incubação.

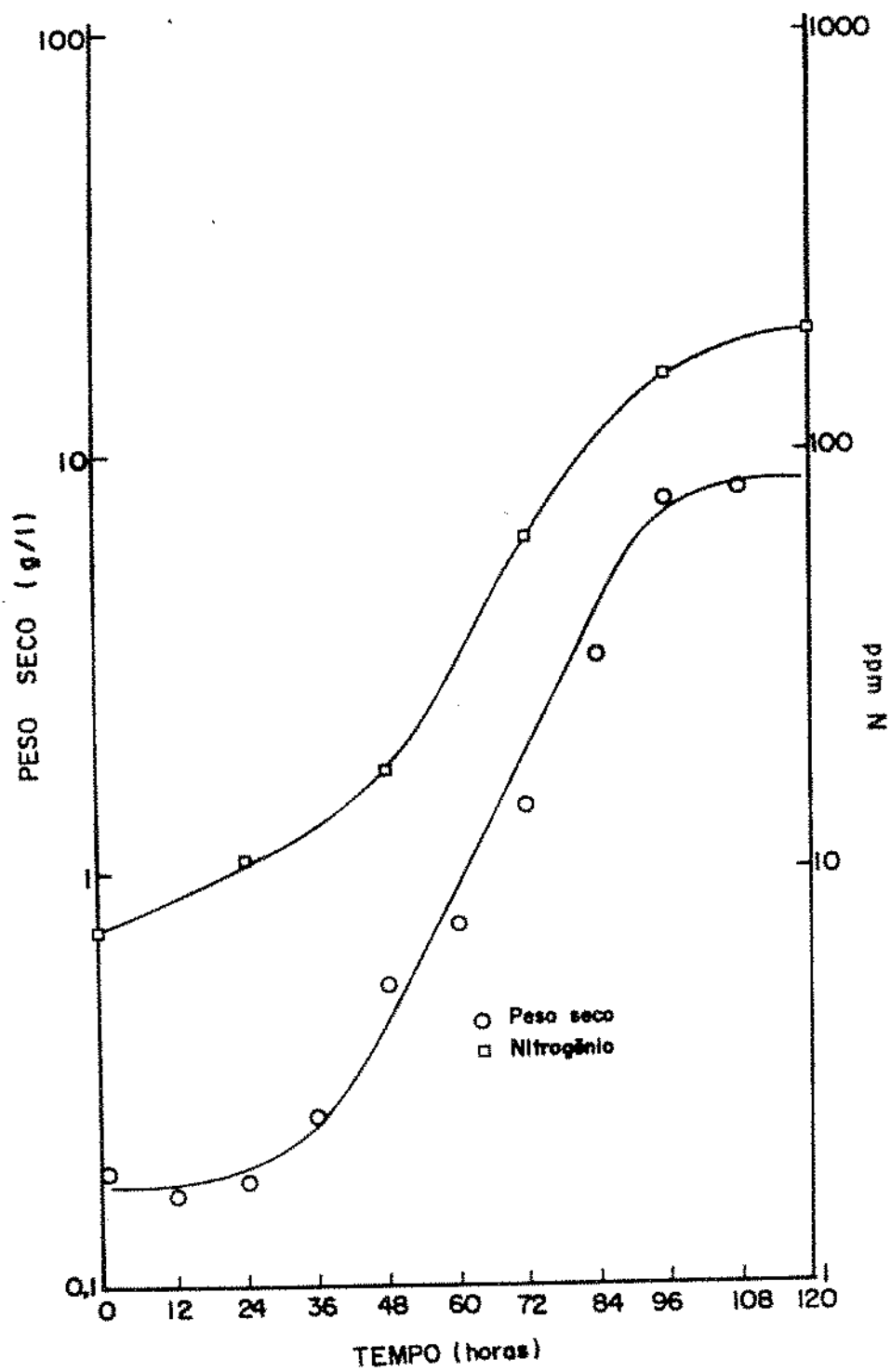


Fig. 1. *Beijerinckia sp.*
Meio I

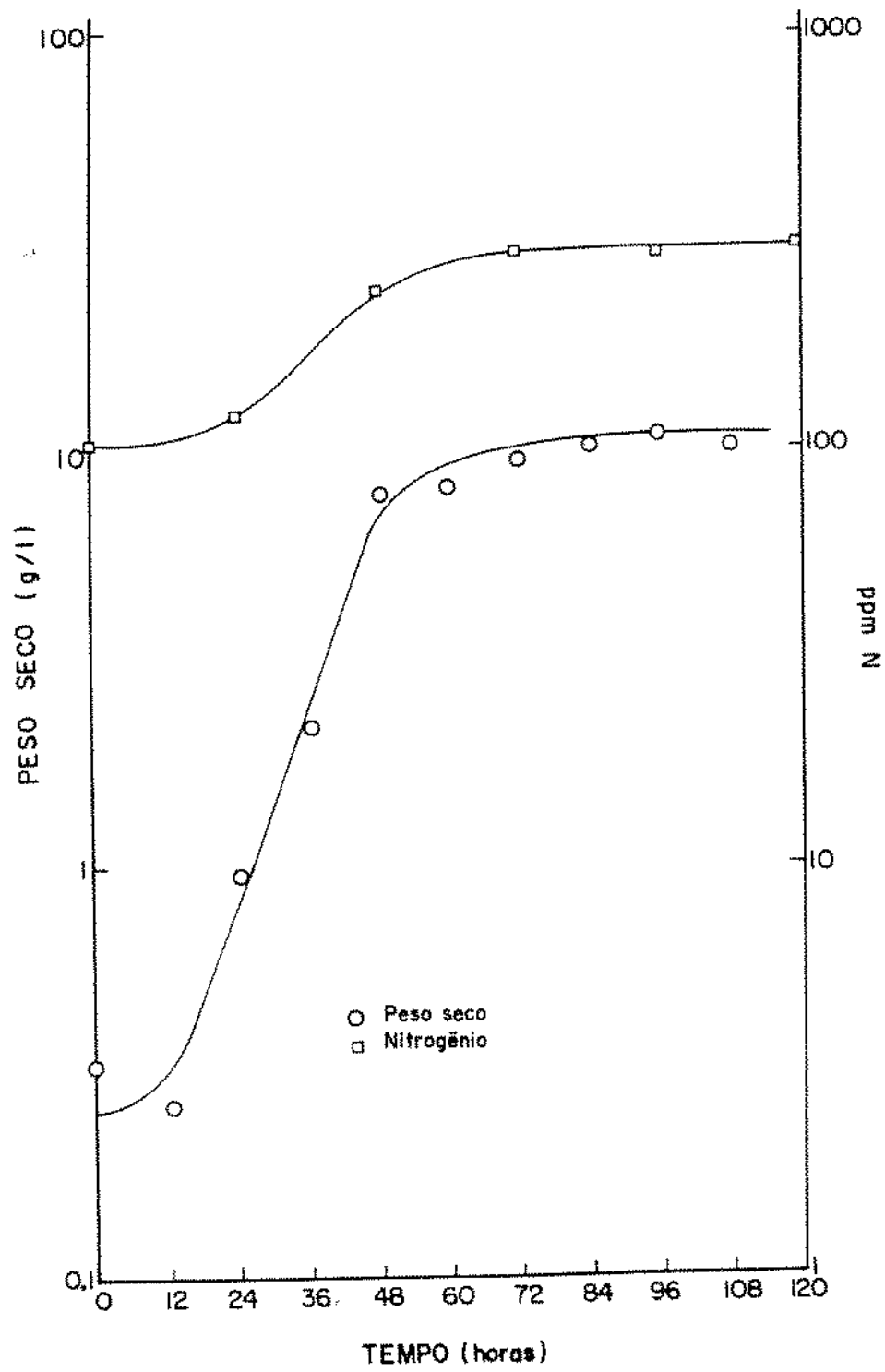


Fig. 2. *Beijerinckia sp*
Meio VIII

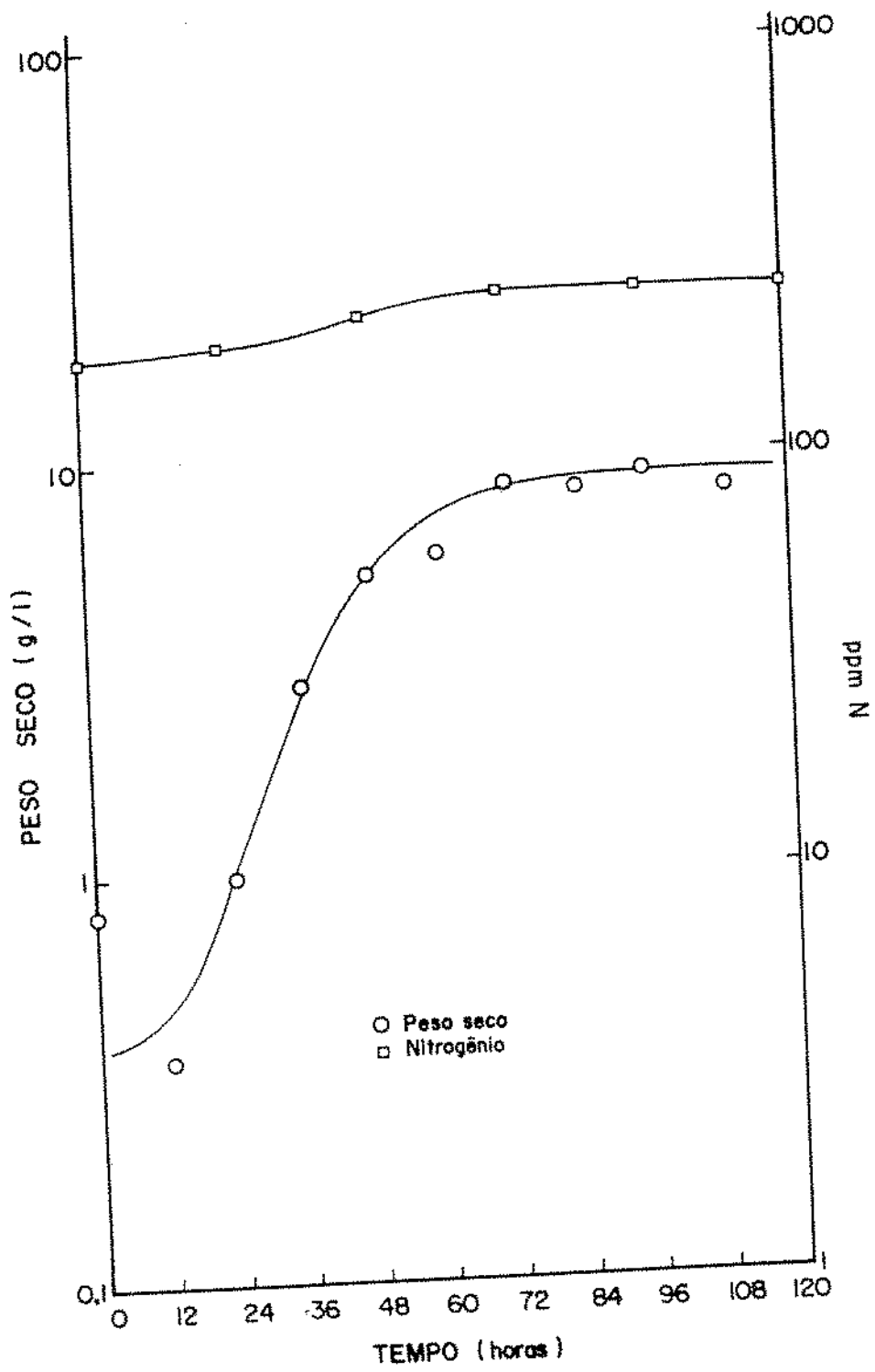


Fig. 3. *Beijerinckia* sp
Meio XI

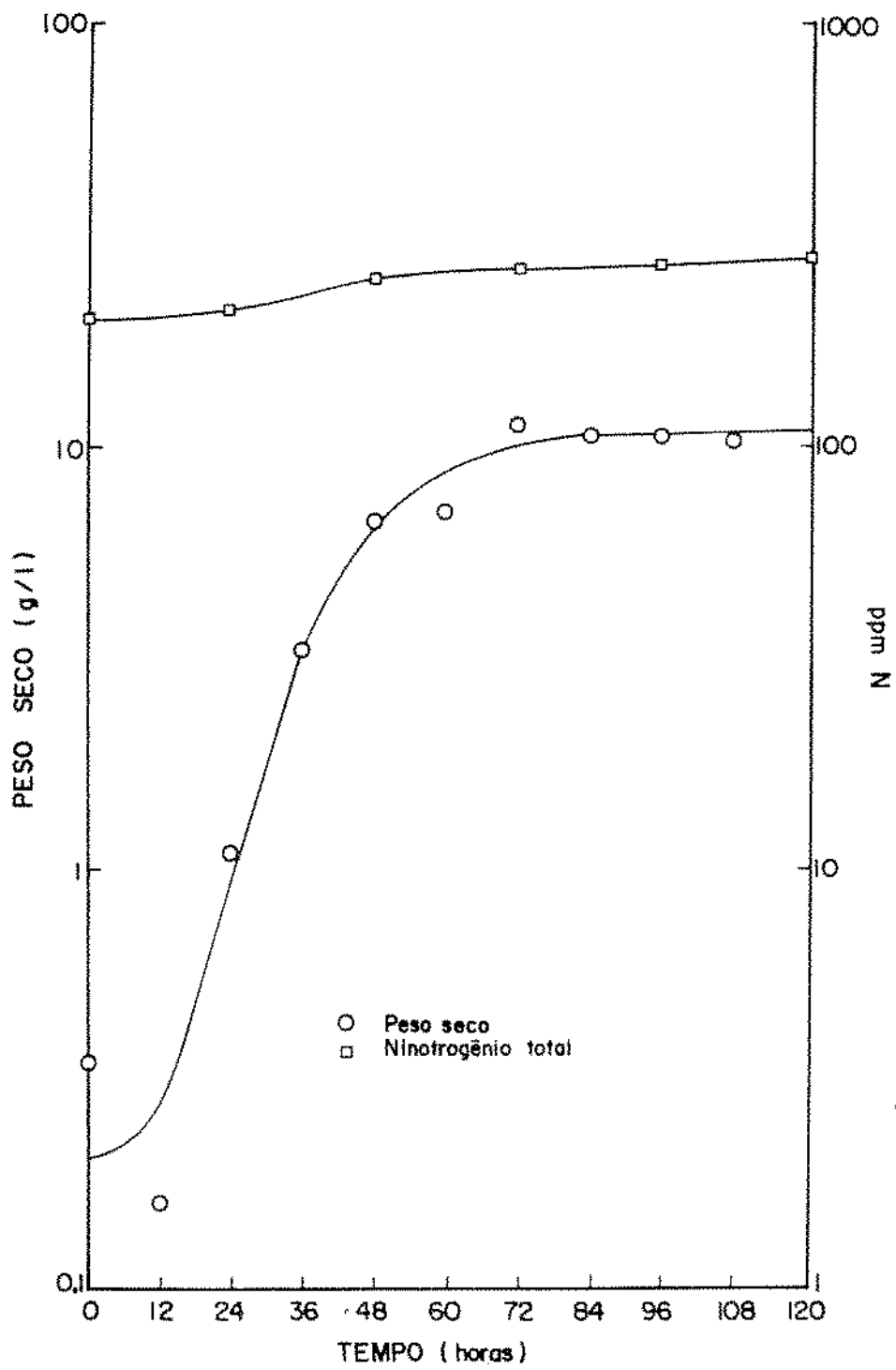


Fig. 4. *Beijerinckia* sp
Meio XIV

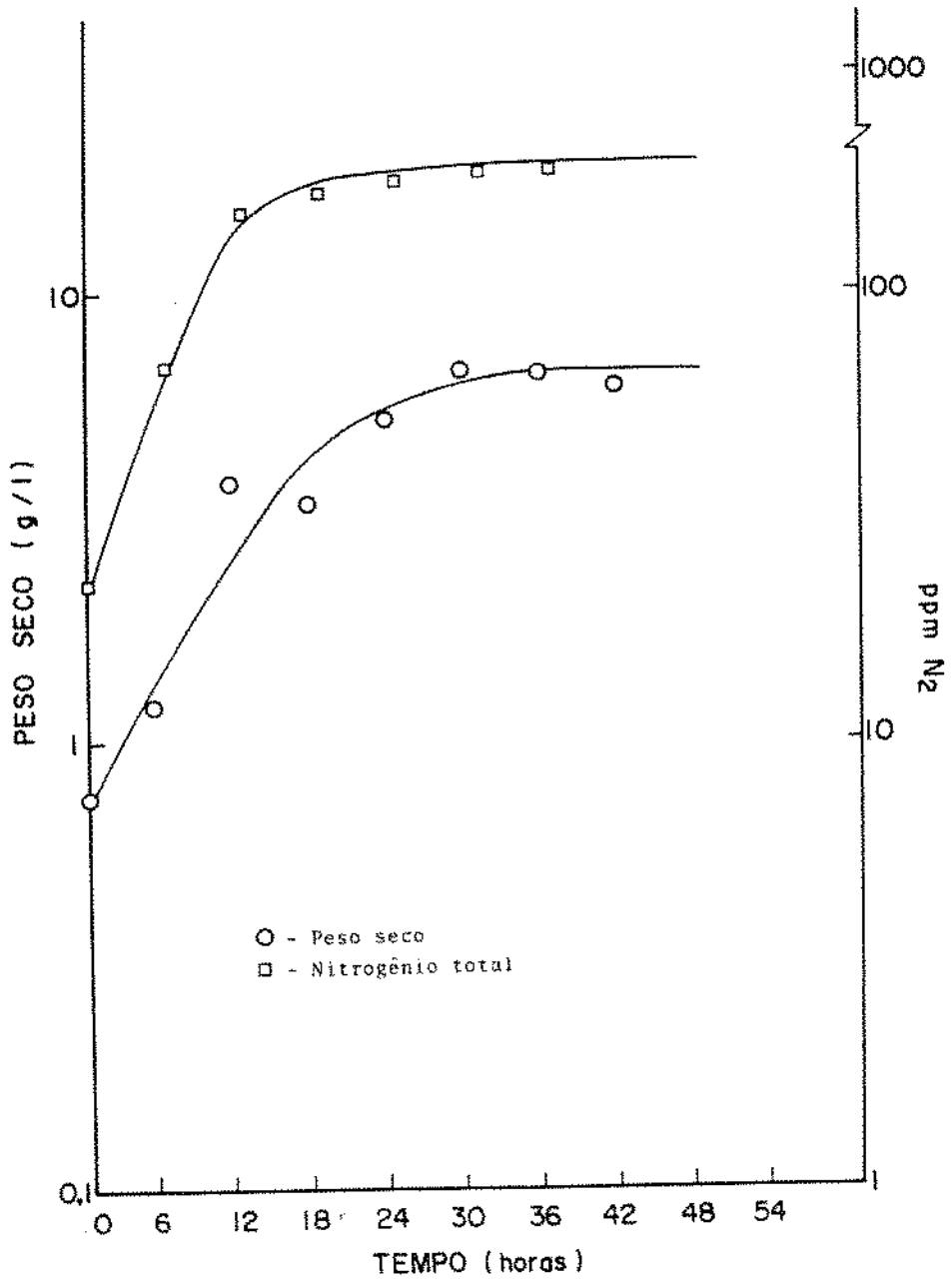


Fig. 5. *Azotobacter vinelandii*
Meio II

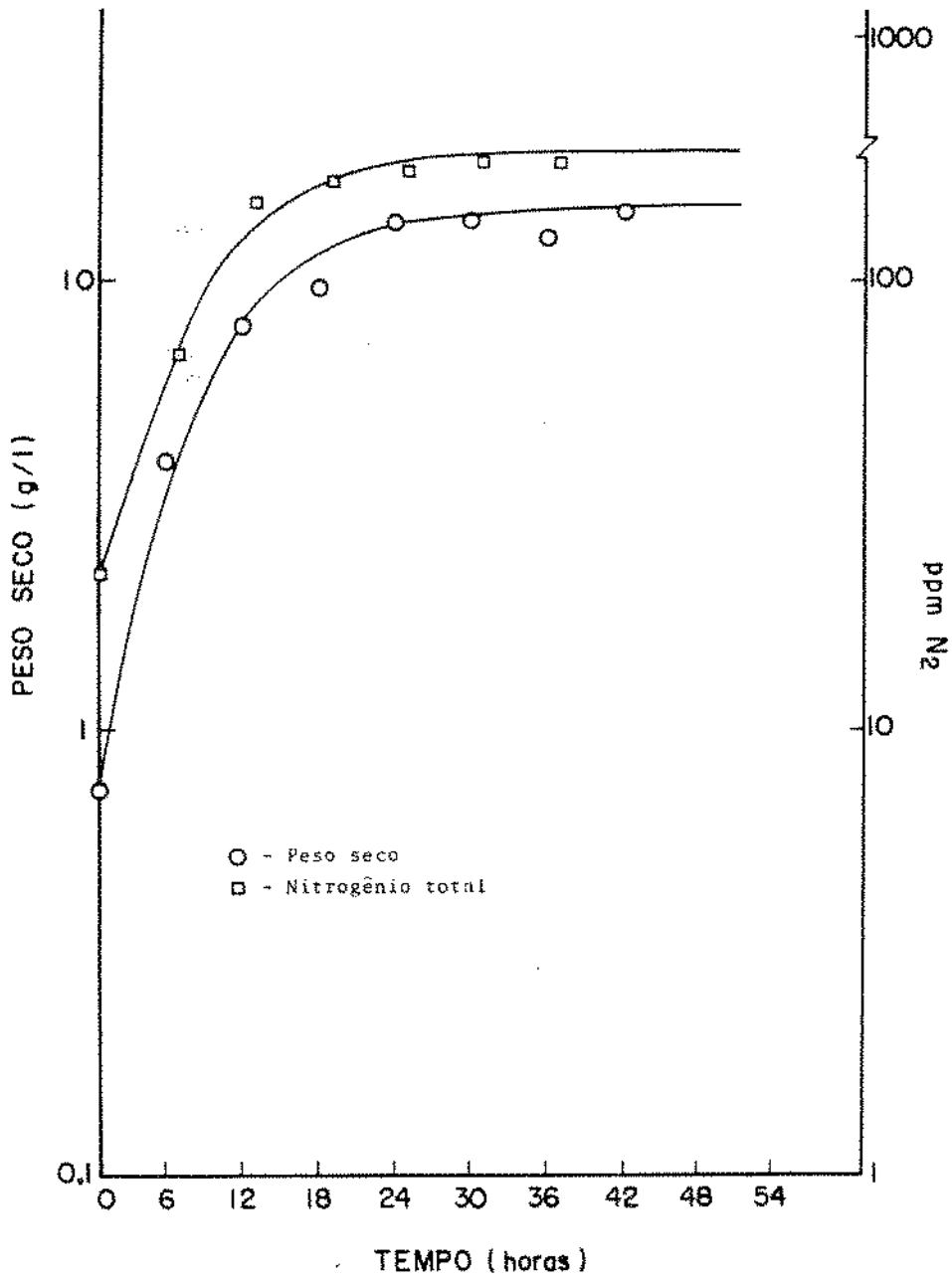


Fig. 6. *Azotobacter vinelandii*
Meio IX

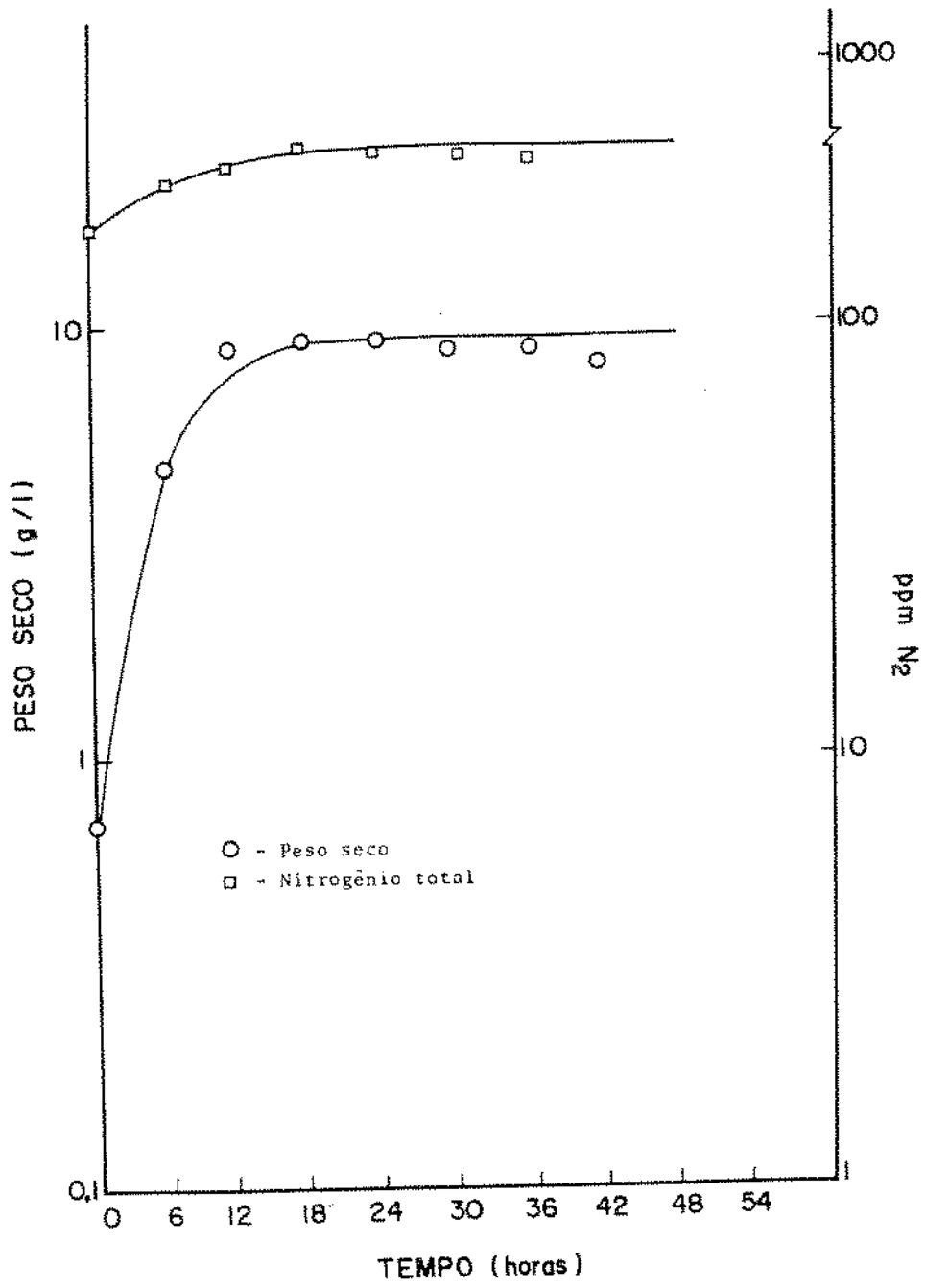


Fig. 7. *Azotobacter vinelandii*
 Meio XII

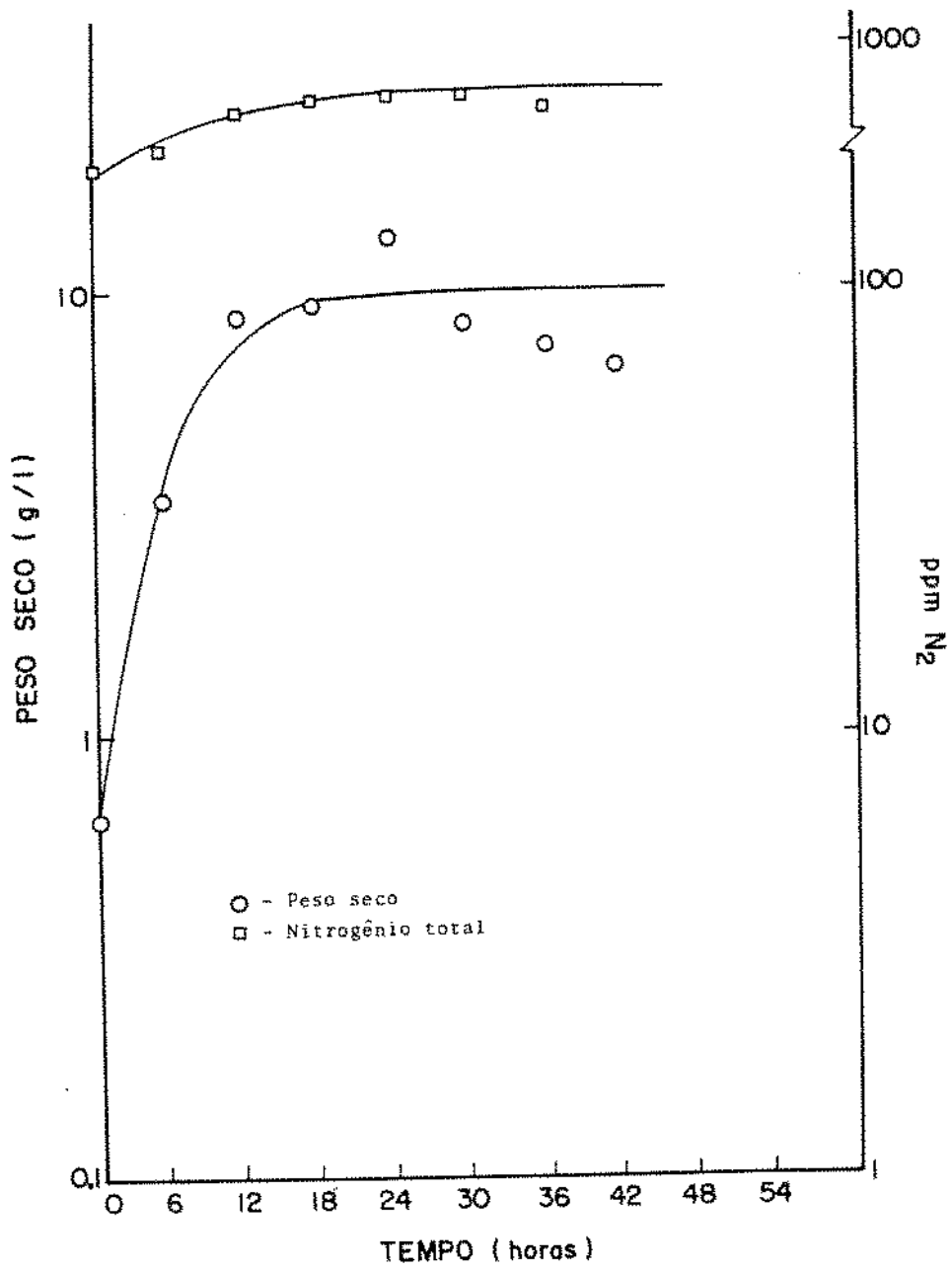


Fig. 8. *Azotobacter vinelandii*
Meio XIV

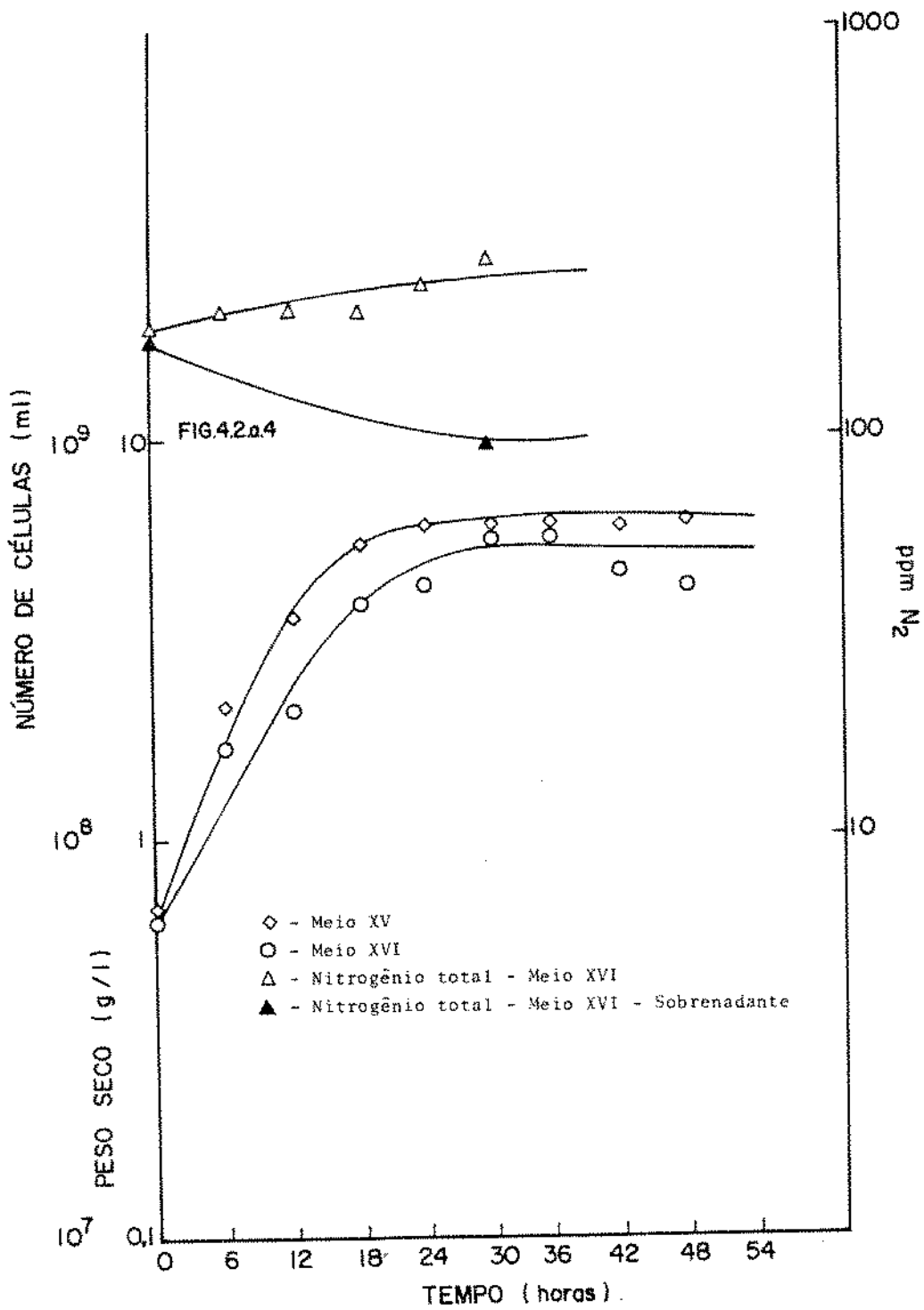


Fig. 9. Crescimento de *C. utilis* em Meio XV e XVI (peso seco) nitrogênio total em Meio XVI, pH inicial 4,6.

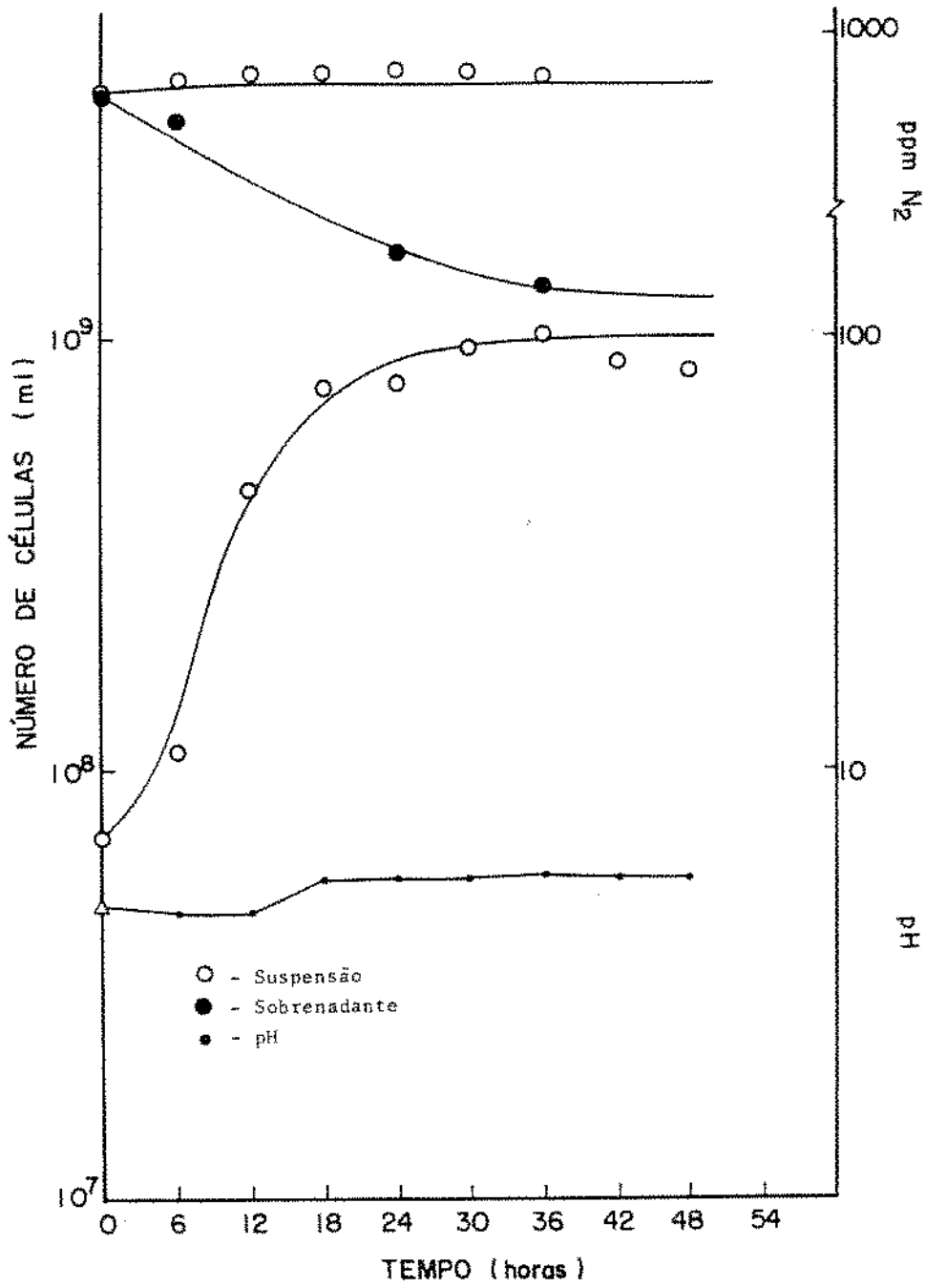


Fig. 10. Crescimento de *C. utilis* em Meio de Cultura XV (número de células), pH inicial 4,6.

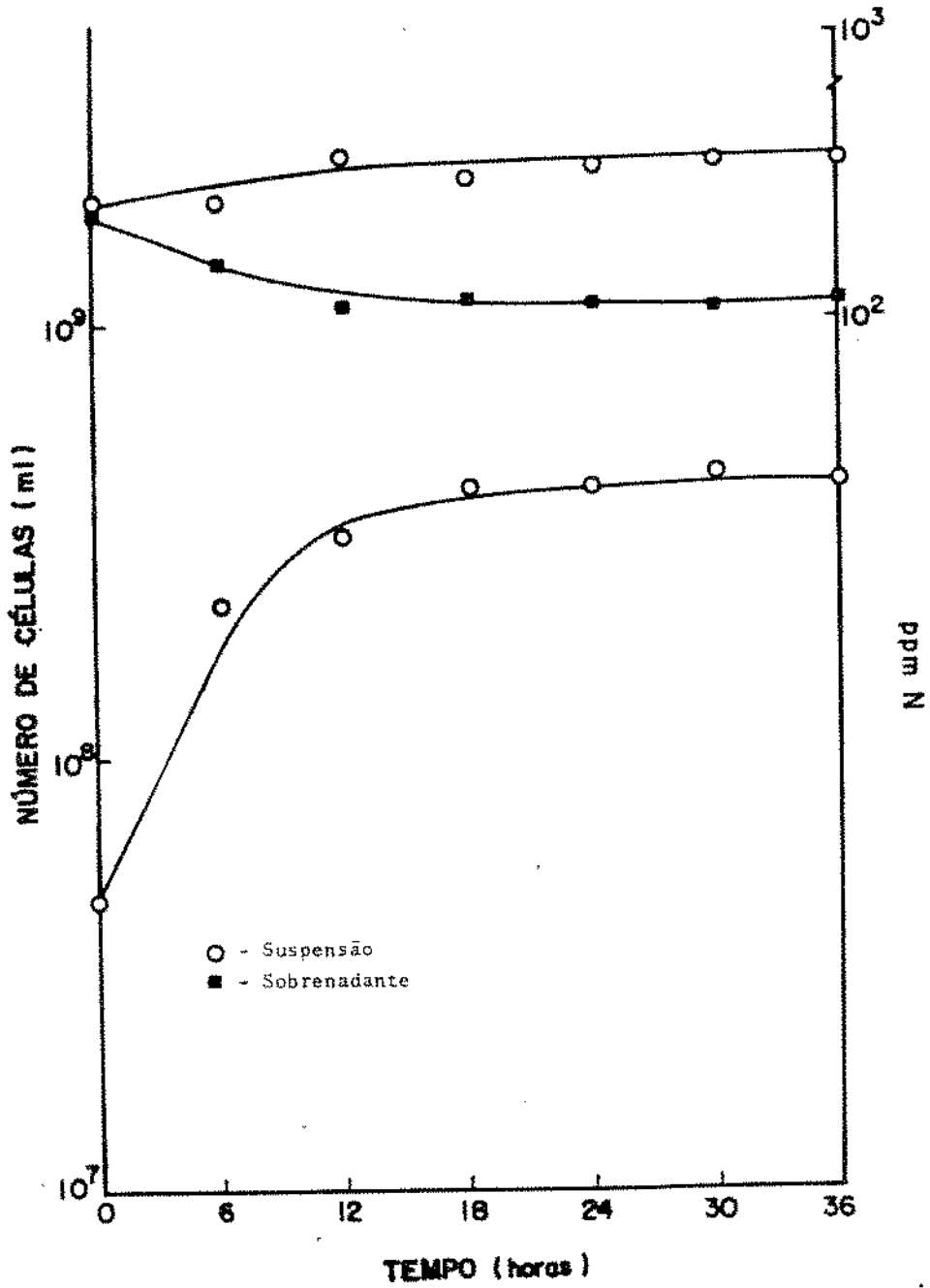


Fig. 11. Crescimento (número de células) de *C. utilis* em Meio XVI e nitrogênio total da suspensão e sobrenadante, em Meio XVI, pH inicial 4,6.

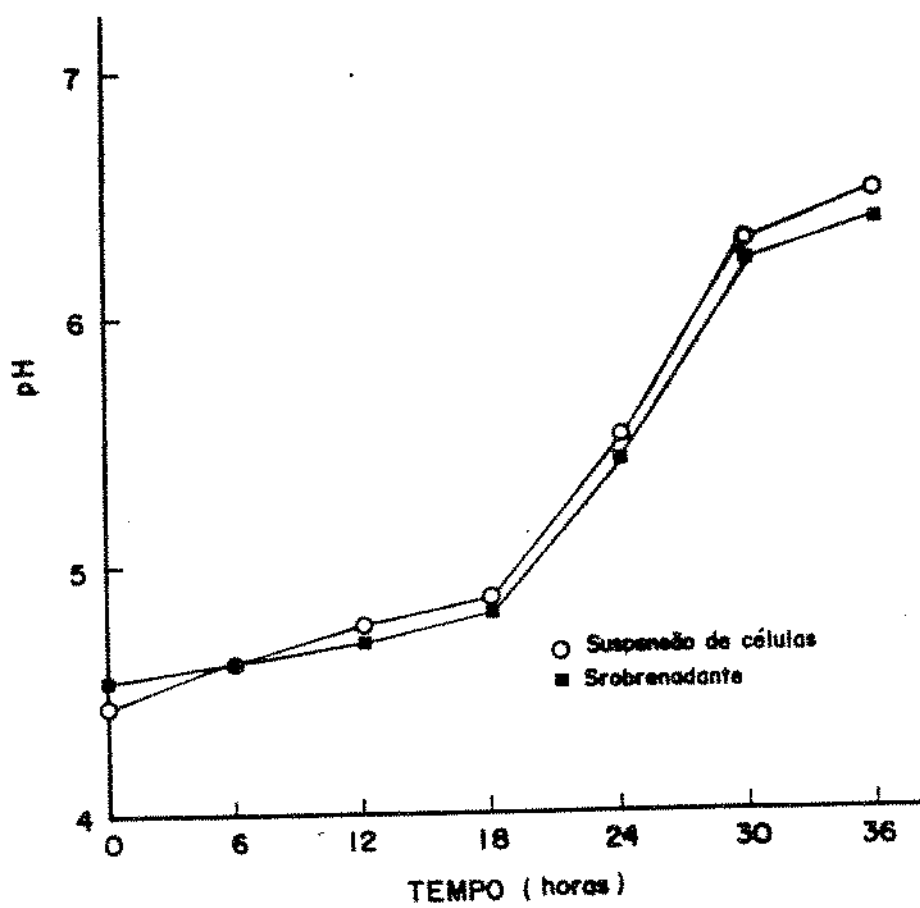


Fig. 12. pH da suspensão e do sobrenadante de *C. utilis* no Meio XVI.

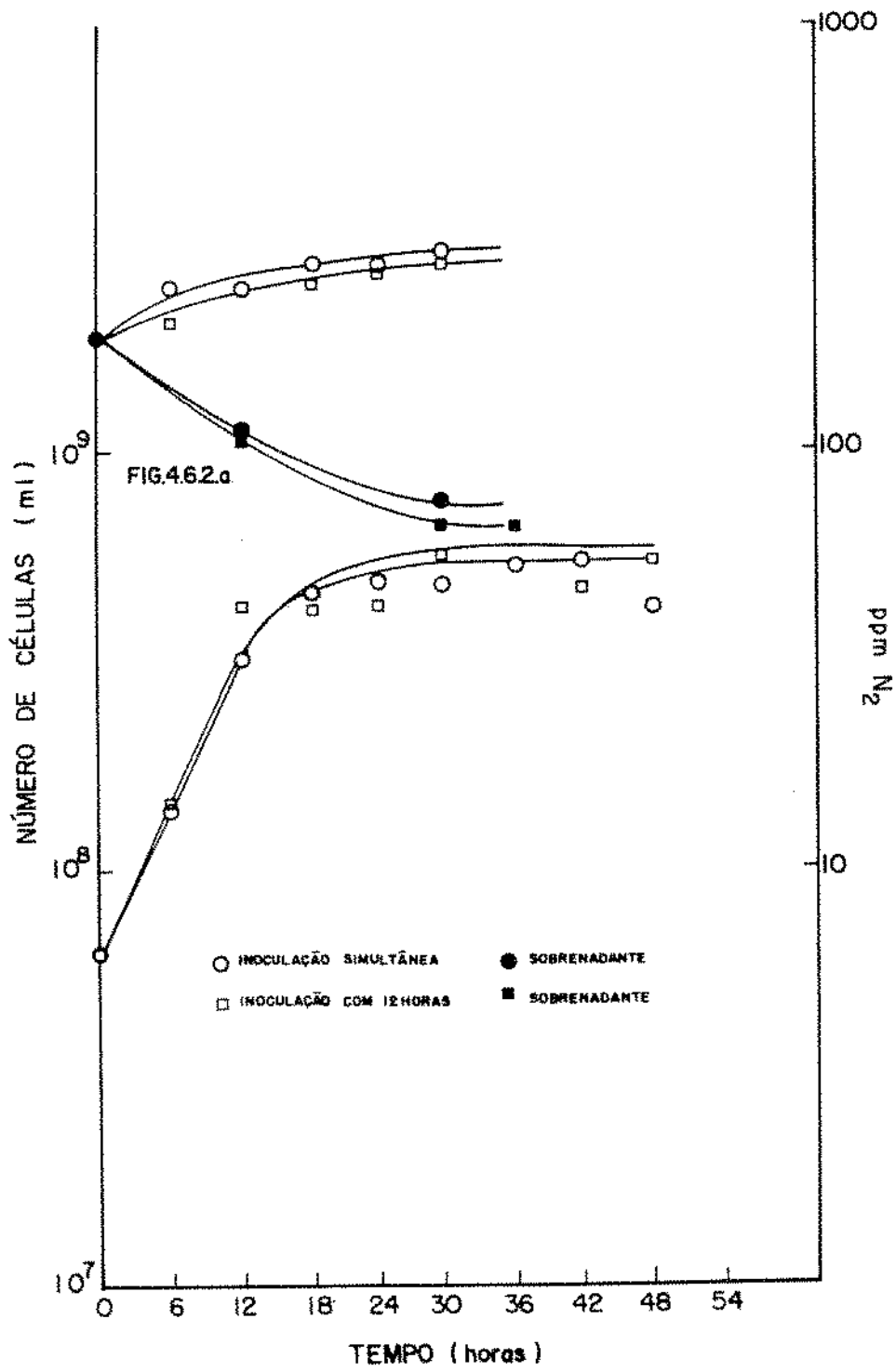


Fig. 13. Crescimento de *C. utilis* e *A. vinelandii* com inoculação simultânea e com inoculação de *A. vinelandii* após 12 horas, pH inicial 4,6.

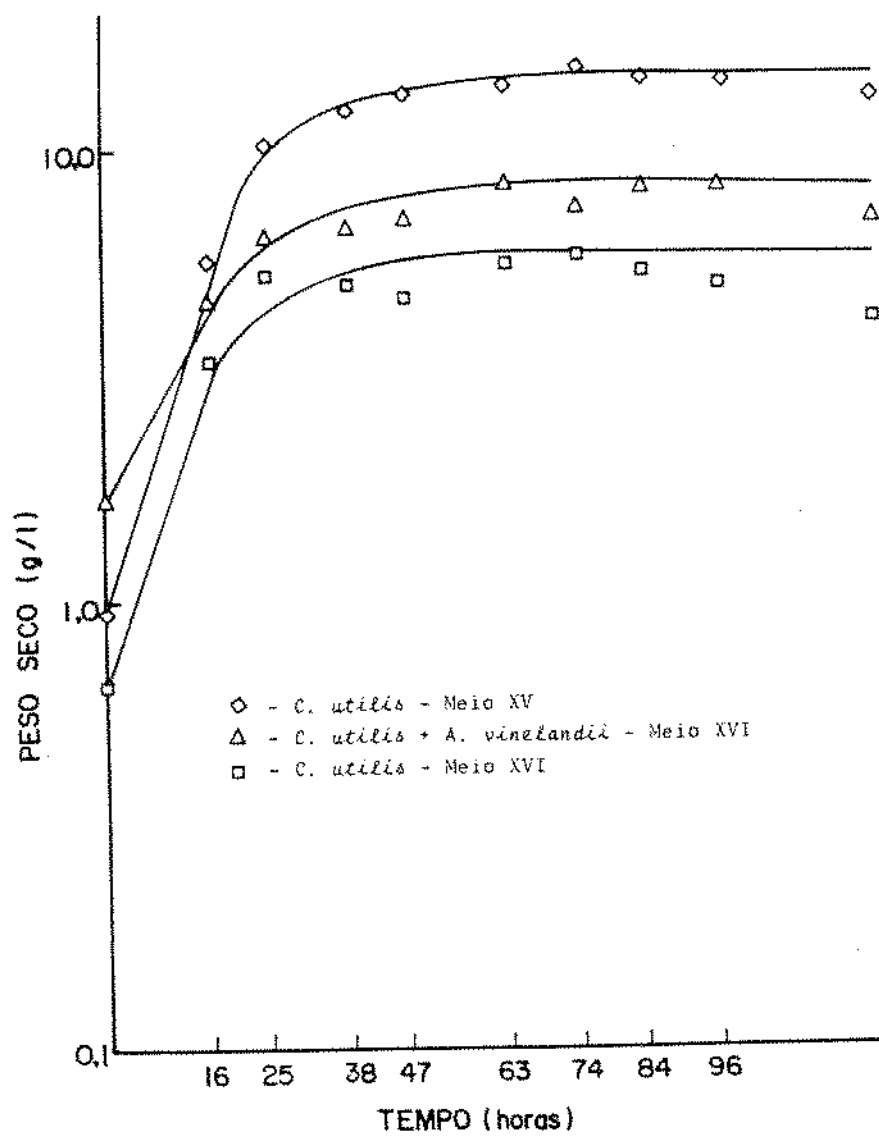


Fig. 14. Crescimento de *C. utilis* e *A. vinelandii* com Meio XVI, *C. utilis* com Meio XV e XVI em pH inicial 4,15. (Peso seco).

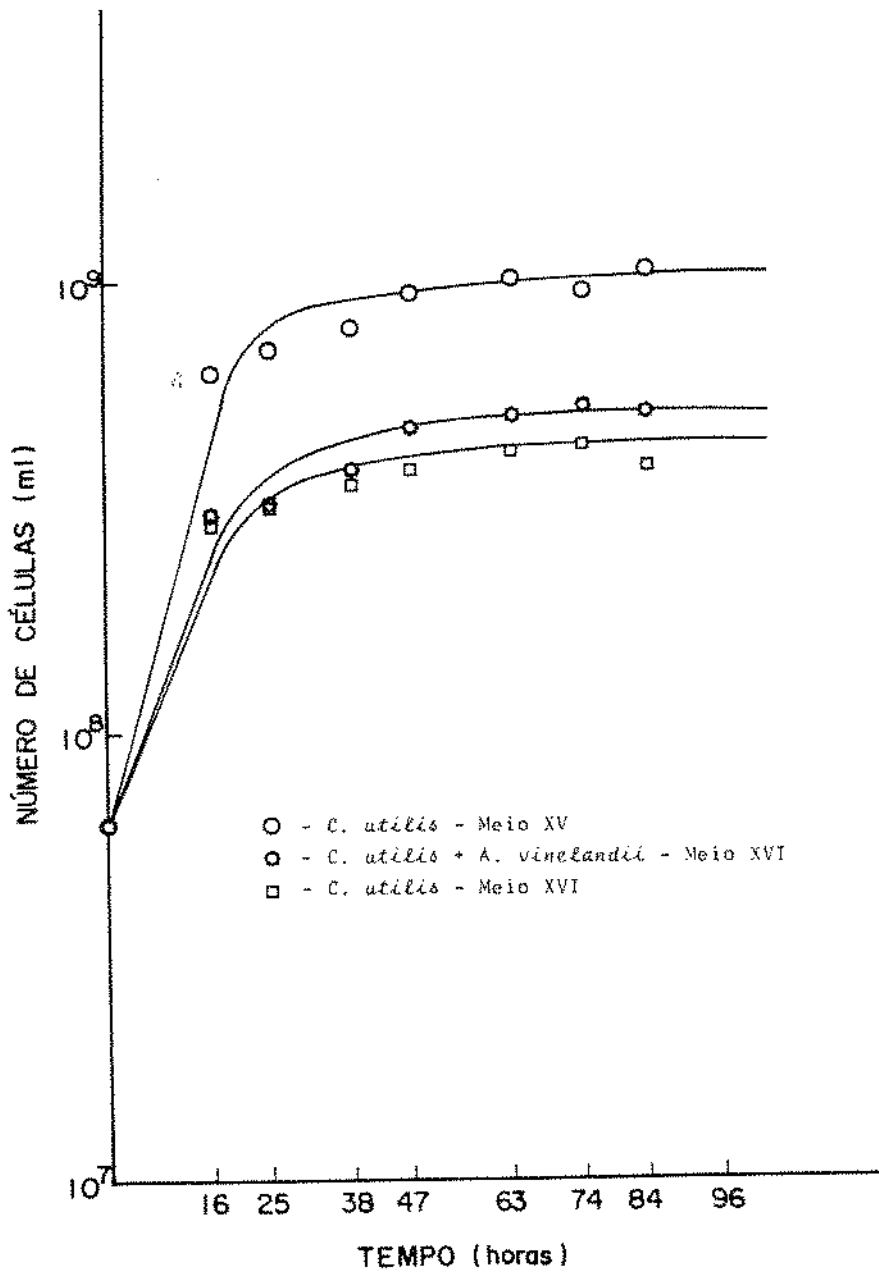


Fig. 15. Crescimento de *C. utilis* + *A. vinelandii* em Meio XVI, *C. utilis* em Meio XV e XVI em pH inicial 4,15. (Número de células).

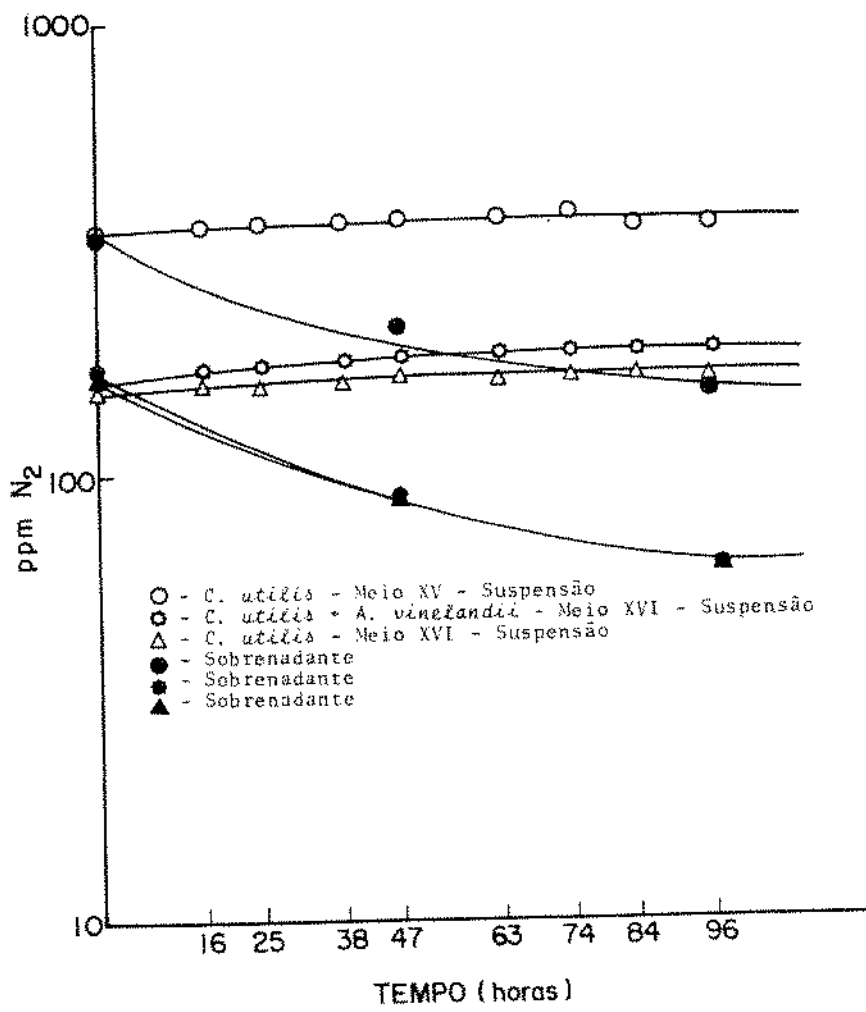


Fig. 16. Nitrogênio total de *C. utilis* + *A. vinelandii* em Meio XVI e *C. utilis* em Meios XV e XVI, pH inicial 4,15.

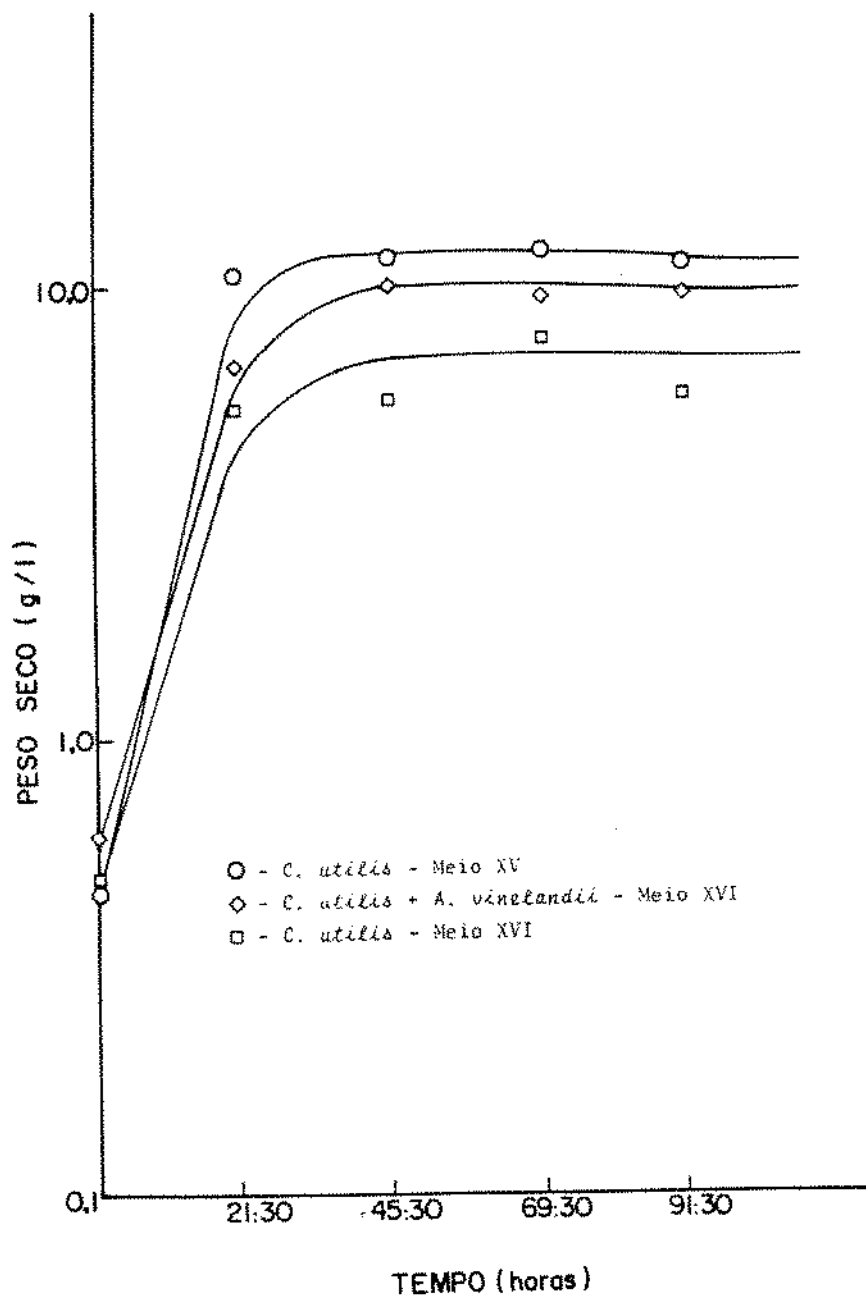


Fig. 17. Crescimento de *C. utilis* + *A. vinelandii* em Meio XVI e *C. utilis* em Meios XV e XVI, pH inicial 6,0. (Peso seco).

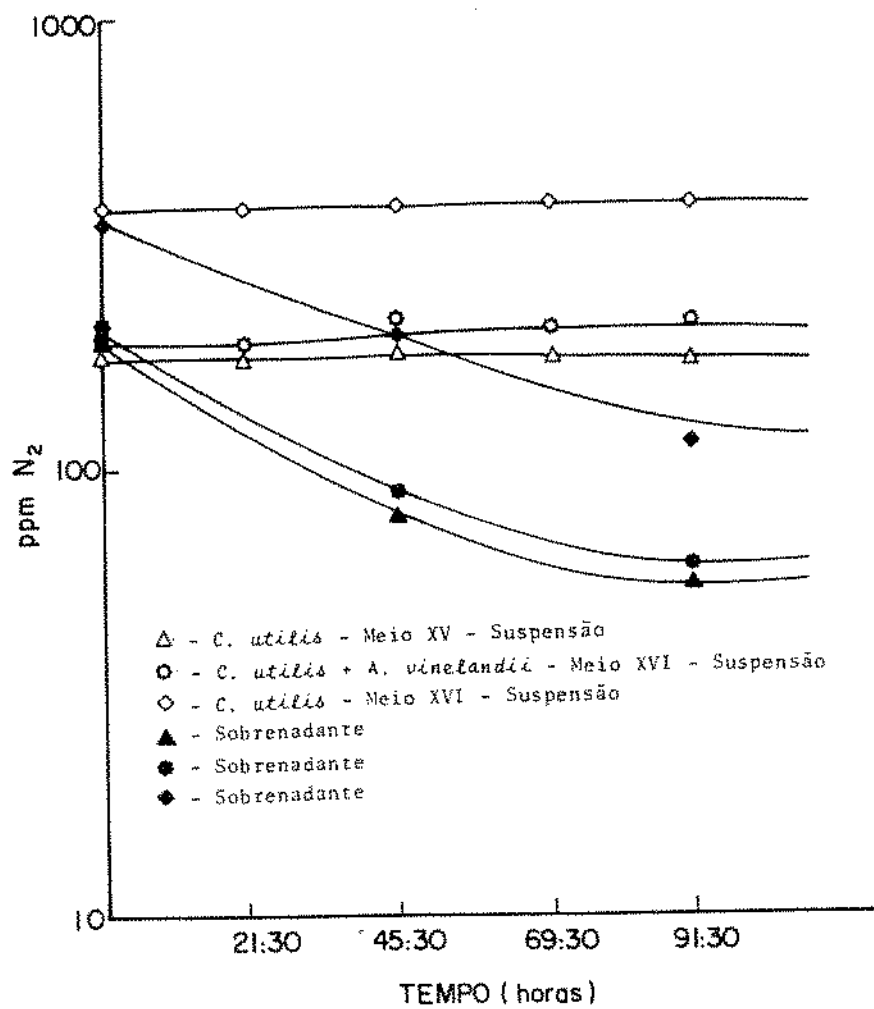


Fig. 19. Nitrogênio total de *C. utilis* + *A. vinelandii* em Meio XVI e *C. utilis* em Meios XV e XVI, pH inicial 6,0.

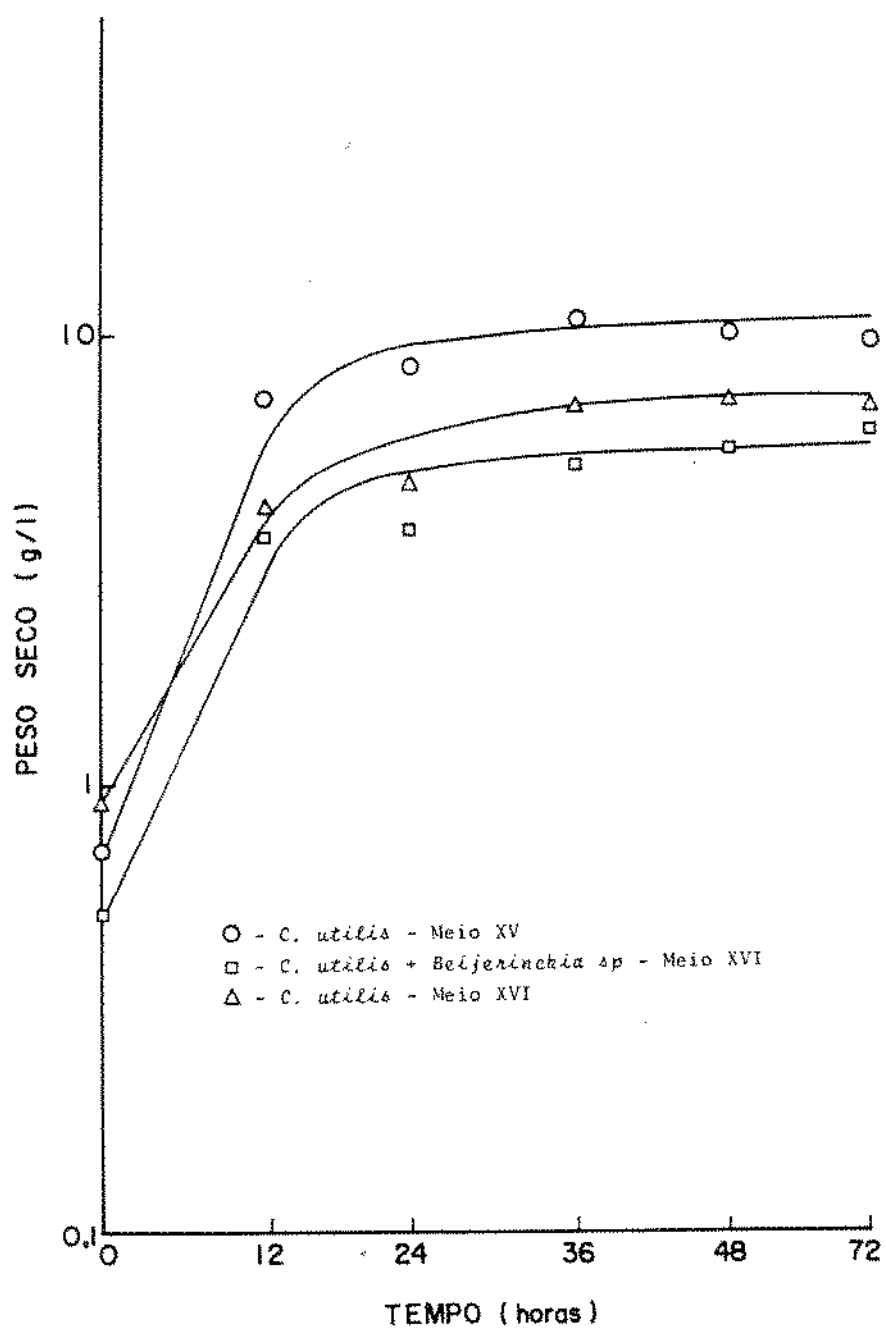


Fig. 20. Crescimento de *C. utilis* + *Beijerinckia* sp em Meio XVI, e *C. utilis* em Meios XV e XVI, pH inicial 6,0. (Peso seco).

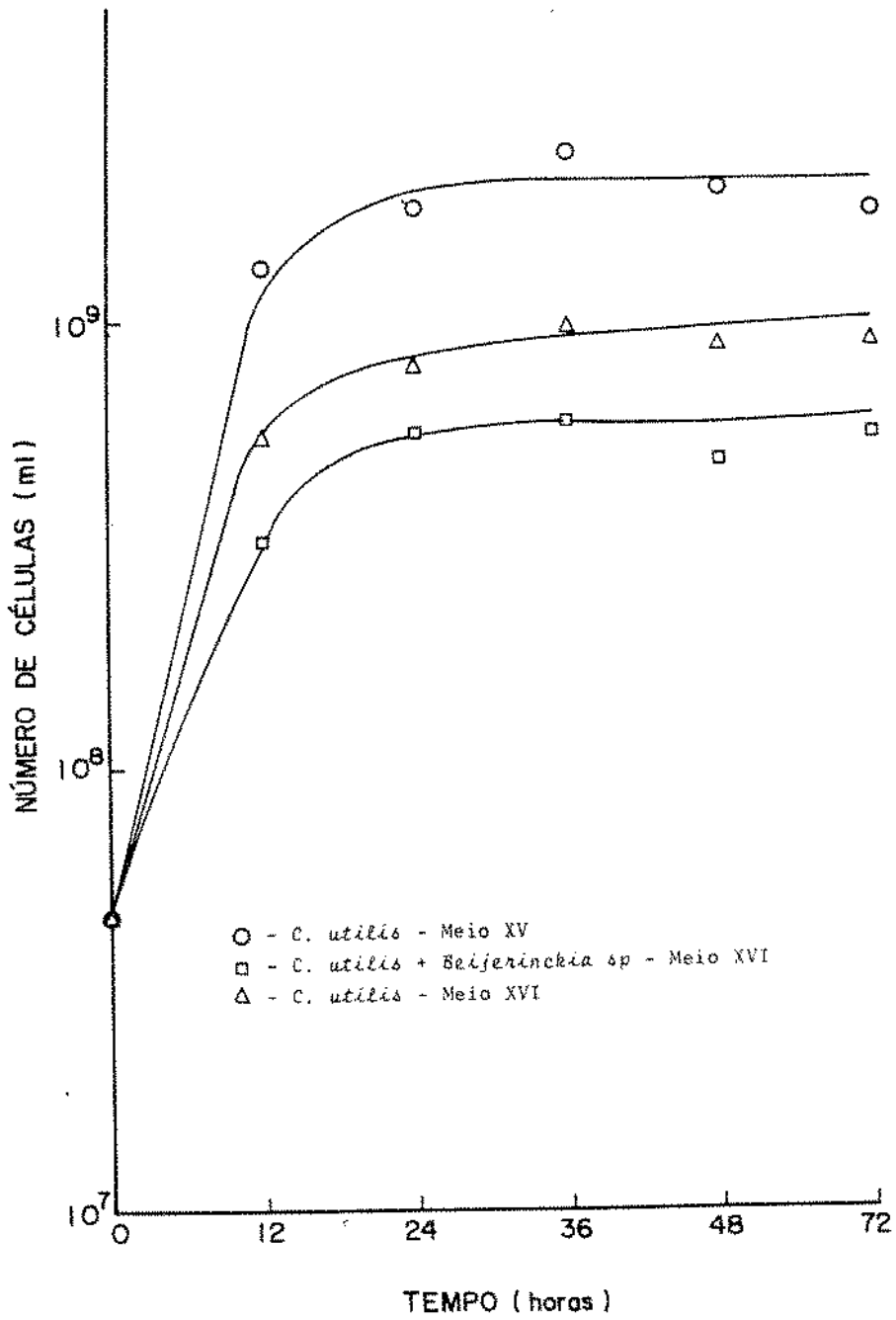


Fig. 21. Crescimento de *C. utilis* + *Beijerinckia* sp em Meio XVI, e *C. utilis* em Meios XV e XVI, pH inicial 6,0. (Número de células).

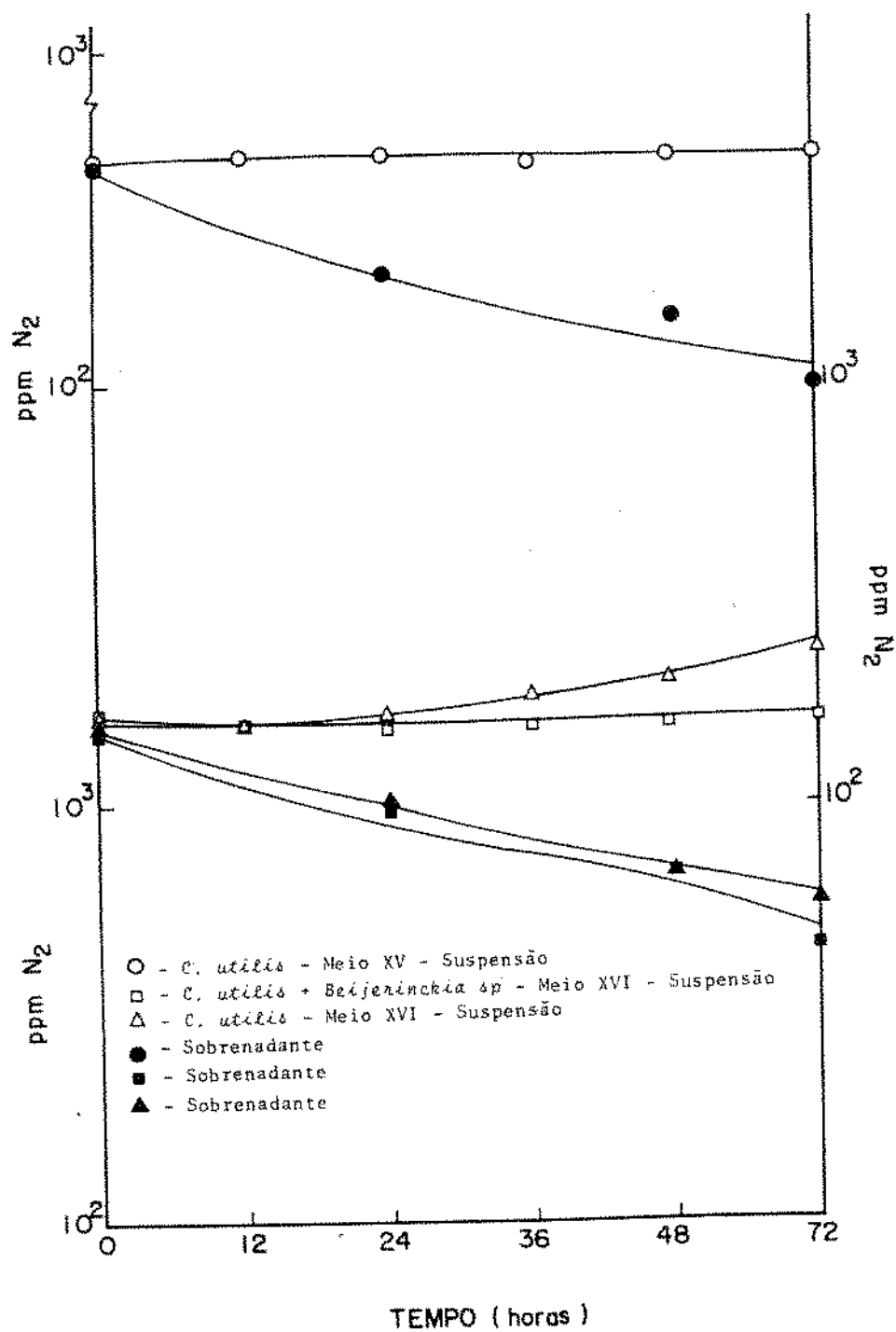


Fig. 22. Nitrogênio total de *C. utilis* + *Beijerinckia* sp em Meio XVI, e *C. utilis* em Meios XV e XVI, pH inicial 6,0.

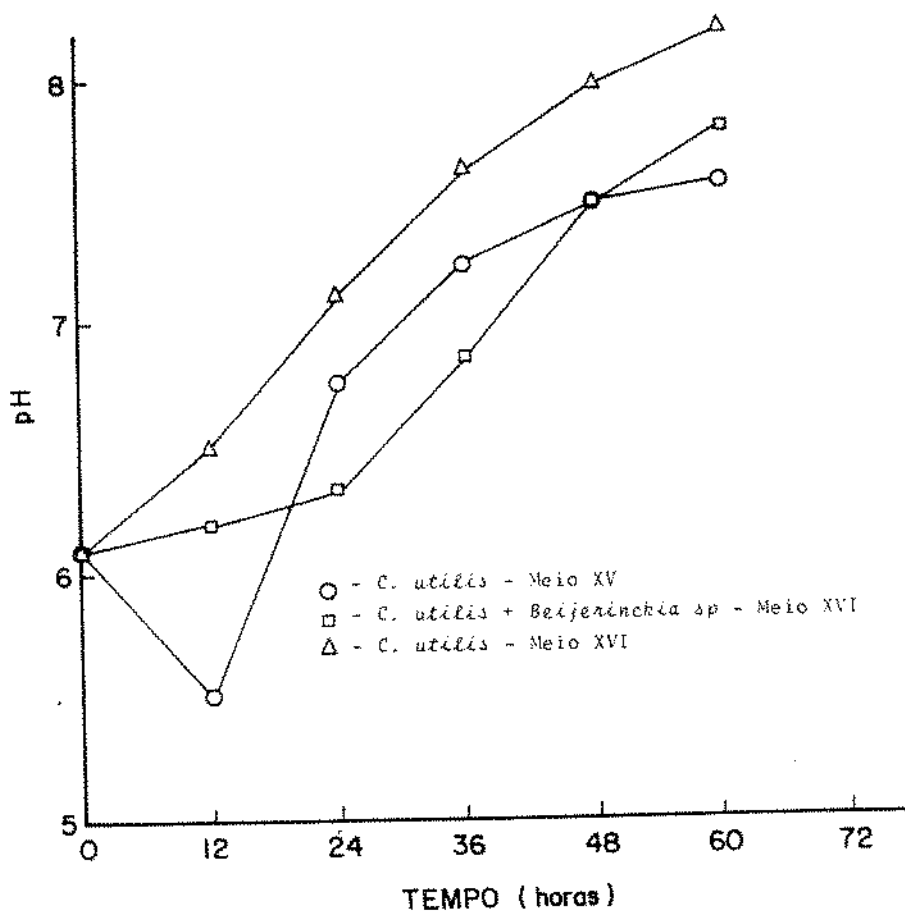


Fig. 23. pH do crescimento de *C. utilis* + *Beijerinckia sp* em Meio XVI, e *C. utilis* em Meios XV e XVI.

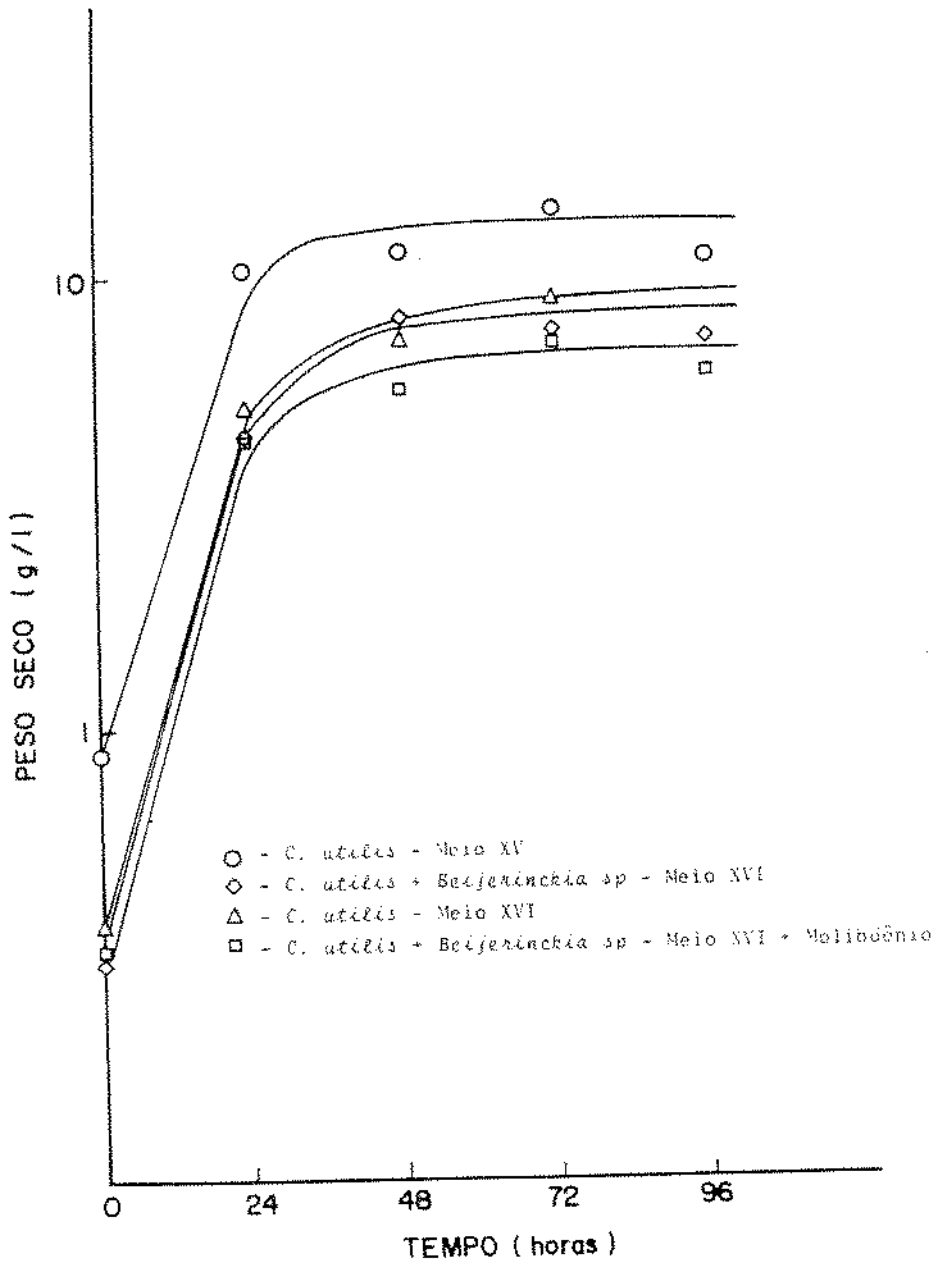


Fig. 24. Crescimento de *C. utilis* + *Beijerinckia sp* em Meio XVI e *C. utilis* em Meios XV e XVI, com vinhoto de outra partida, pH inicial 6,0. (Peso seco).

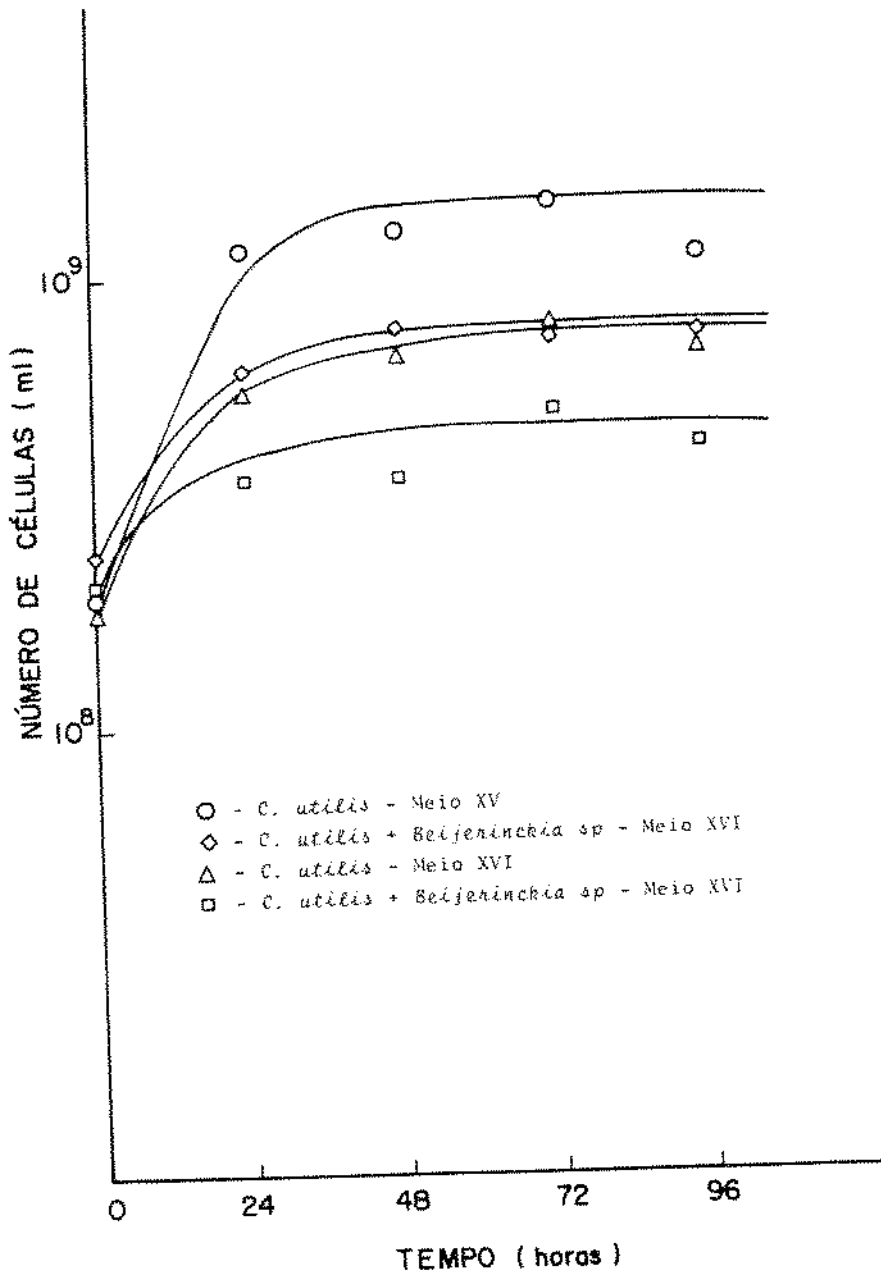


Fig. 25. Crescimento de *C. utilis* + *Beijerinckia* sp em Meio XVI e *C. utilis* em Meios XV e XVI, com vinhoto de outra partida, pH inicial 6,0. (Número de células).

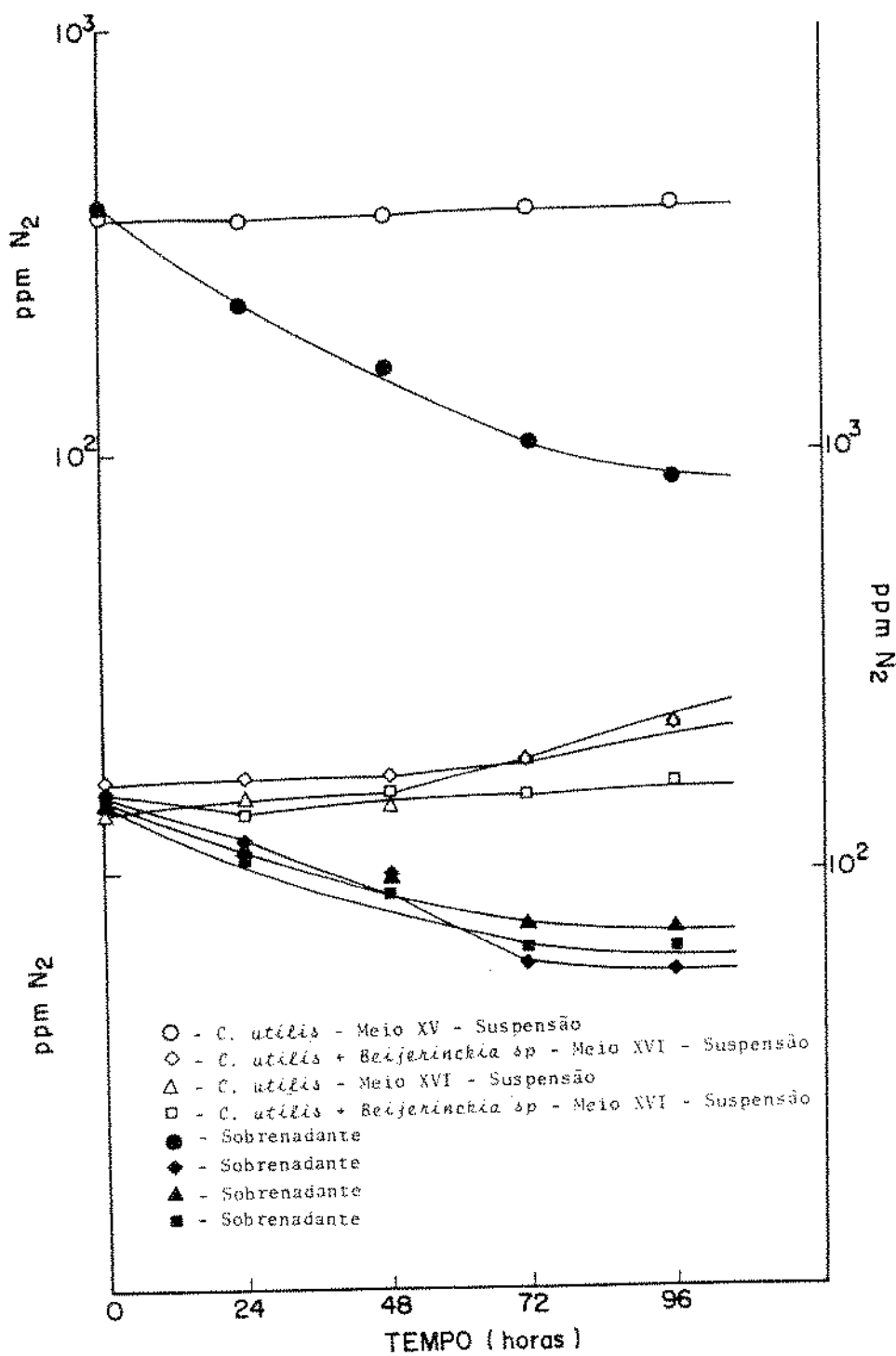


Fig. 26. Nitrogênio total de *C. utilis* + *Beijerinckia* sp em Meio XVI e *C. utilis* em Meio XV e XVI, com vinhoto de outra partida, pH inicial 6,0.

Amostra	D.B.O. (mg/l)	D.Q.O. (mg/l)	N Orgânico (mg/l)
Vinhoto Natural Estéril, Clarificado, pH 6.0 (1ª Partida)	10,500	25,726	191
Tratamento 1 Vinhoto + $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,1% C. utilis	2,800	9,319	16
Tratamento 2 Vinhoto + Na_2HPO_4 0,1% C. utilis	5,200	14,562	16
Tratamento 3 Vinhoto + Na_2HPO_4 0,1% C. utilis + <i>Beijerinckia</i> spp	2,800	8,737	7,3

Quadro 2: Análises de D.B.O., D.Q.O., N. Orgânico, realizadas pela FEEMA-RJ, do crescimento misto de *C. utilis* e *Beijerinckia* sp., em pH inicial 6,0, vinhoto 1ª partida.

Amostra	D.B.O. mg/l	D.Q.O. mg/l	N Total mg/l	N. Org. mg/l	N Amoniacal mg/l	pH
Vinhoto Natural Clarif. esteril. (2a. partida)	7.600	21.929	198	181	16,7	4,35
Tratamento 1 Vinhoto + $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,1% C. utilis	2.500	5.517	59	57	1,8	9,00
Tratamento 2 Vinhoto + Na_2HPO_4 0,1% C. utilis	2.900	7.103	52	50	2,3	9,25
Tratamento 3 Vinhoto + Na_2HPO_4 0,1% C. utilis + <i>Beijerinckia</i> spp	1.900	6.689	76	73	2,8	8,24
Tratamento 4 Vinhoto + Na_2HPO_4 0,1% Na_2MoO_4 0.0002% C. utilis + <i>Beijerinckia</i> spp	2.400	6.896	48	45	3,3	9,35

Quadro 3: Análises de D.B.O., D.Q.O., Nitrogênio Total Orgânico e amoniacal, pH, realizadas pela FEEMA, do crescimento misto de *C. utilis* e *Beijerinckia* sp., em pH inicial 6,0, vinhoto 2ª partida.

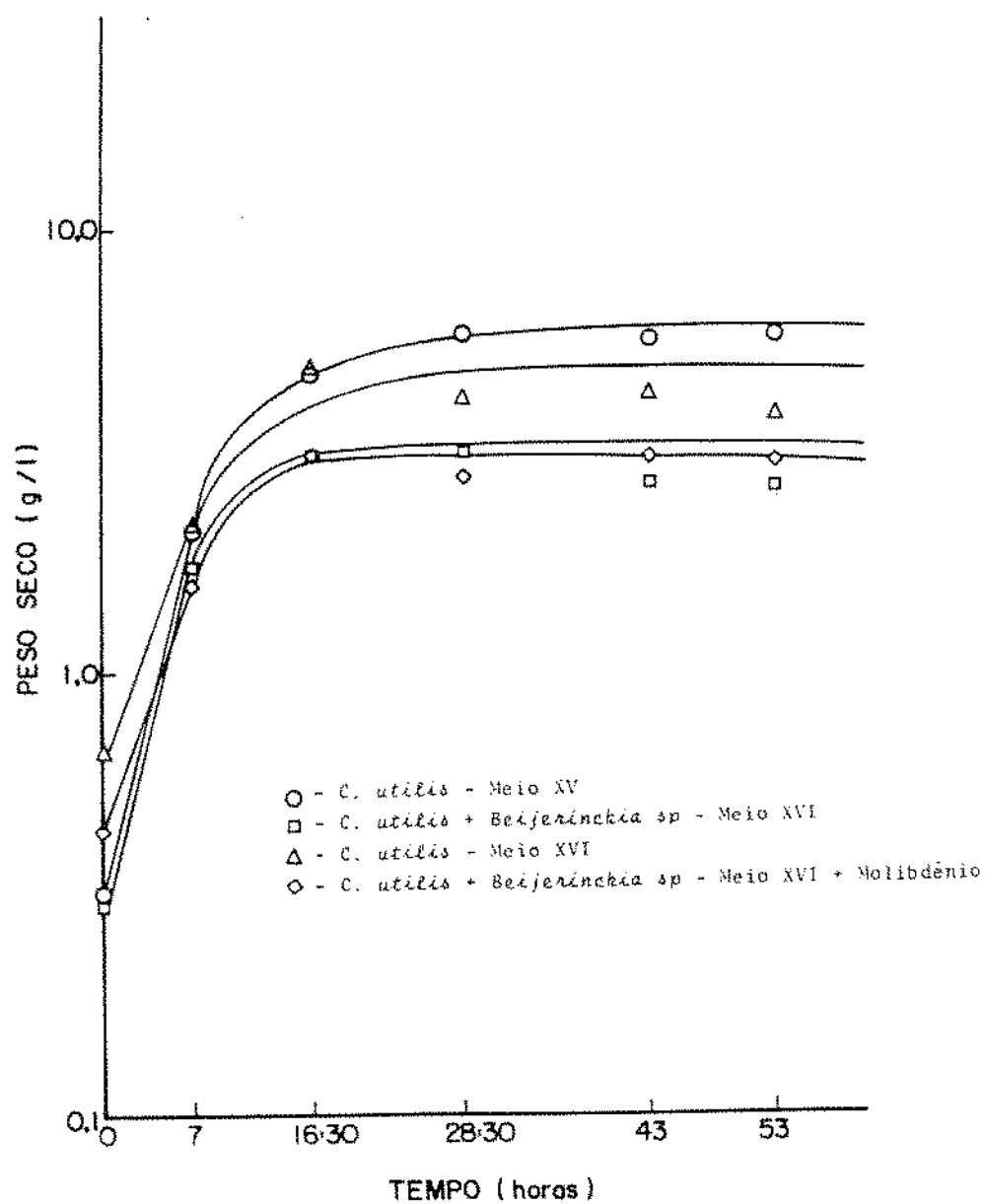


Fig. 27. Crescimento de *C. utilis* + *Beijerinckia sp* em Meio XVI e *C. utilis* em Meios XV e XVI, com vinhoto de outra partida, pH inicial 6,5. (Peso seco).

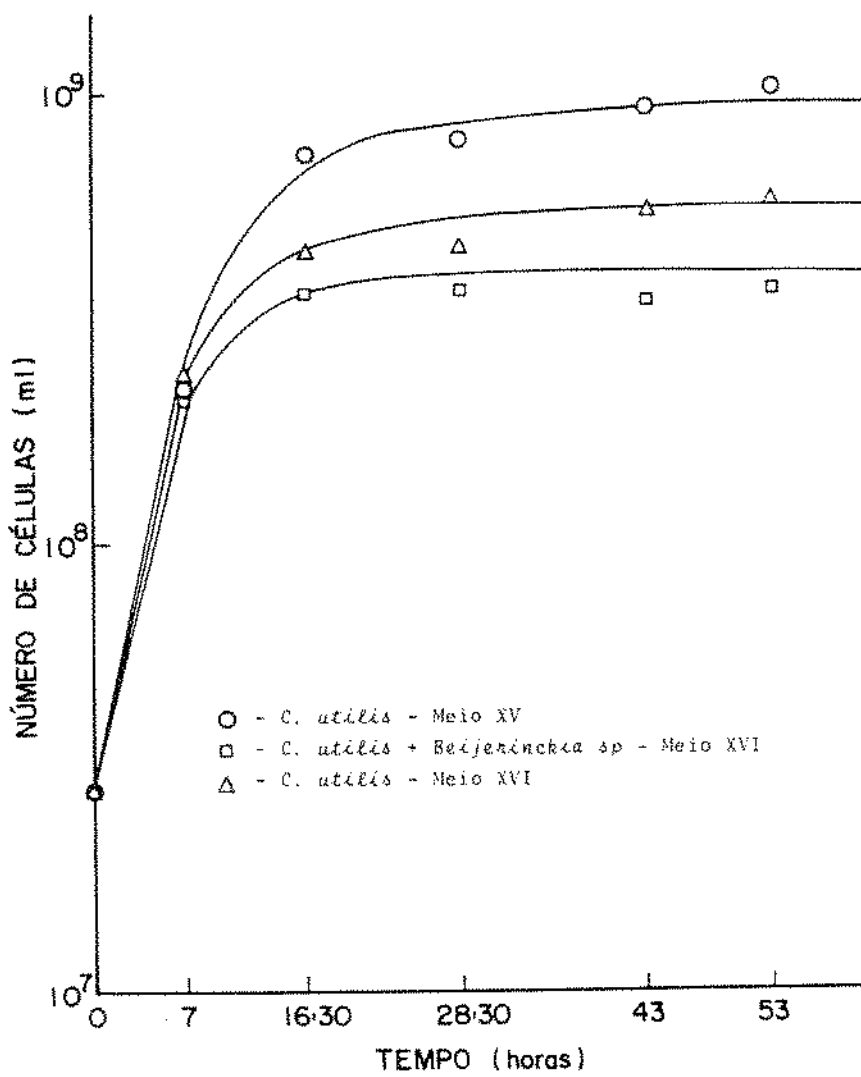


Fig. 28. Crescimento de *C. utilis* + *Beijerinckia sp* em Meio XVI e *C. utilis* em Meios XV e XVI, com vinhoto de outra partida, pH inicial 6.5. (Números de células)².

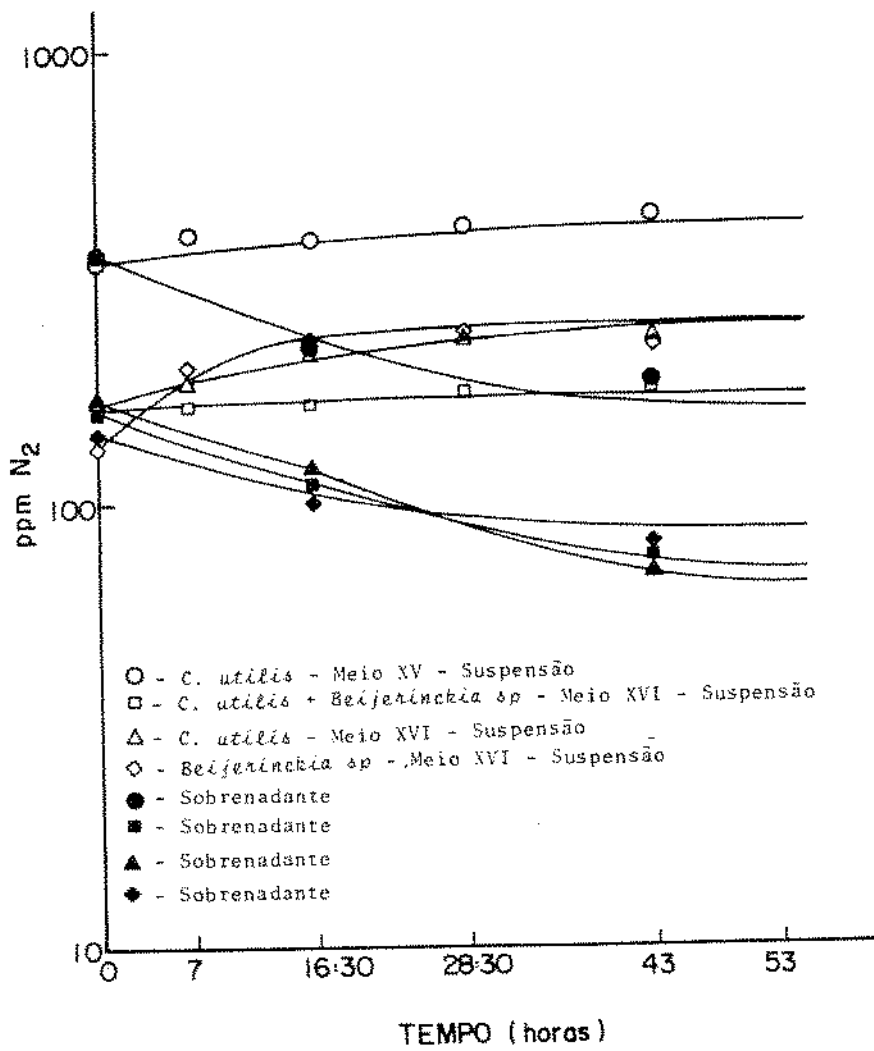


Fig. 29. Nitrogênio total de *C. utilis* e *Beijerinckia sp* em meio XVI e *C. utilis* em Meios XV e XVI, com vinhoto de outra partida, pH inicial 6,5.

Amostra	D.B.O.	D.Q.O.	N Total	N Org.	N Amoniacal	pH
Vinhoto Natural Clarificado em 6.5	9.000	20.412	161	152	8.5	6.18
Tratamento 1 (NH ₄) ₂ HPO ₄ 0,1% C. utilis	3.300	7.241	159	116	4.2	7.78
Tratamento 2 Na ₂ HPO ₄ 0,1% C. utilis	4.000	11.654	84	79	4.8	7.64
Tratamento 3 Na ₂ PO ₄ 0,1% C. utilis + Beijerinckia spp	4.000	9.999	61	57	3.8	7.83
Tratamento 4 Na ₂ HPO ₄ 0,1% Beijerinckia spp	4.600	11.585	70	65	5.0	7.71

Quadro 4: Análises de D.B.O., D.Q.O., Nitrogênio Total, Orgânico e Amoniacal, pH, realizadas pela FEEMA.

Tratamento	Tempo (h)	X	$X_c \times 10^8$	X_n
1	0:00	0,718	0,46073	331,956
1*				318,244
2		0,517	0,46073	164,715
2*				318,244
3		0,918	0,46073	157,679
3*				149,200
1	12:00	7,744	13,247	340,886
2		3,684	3,253	156,957
3		4,286	5,470	154,070
1	24:00	8,508	18,12352	341,066
1*				183,387
2		3,718	5,685	154,431
2*				98,237
3		4,608	7,990	167,601
3*				102,834
1	36:00	10,672	23,693	328,437
2		5,070	5,955	153,890
3		7,144	9,59365	184,109
1	48:00	10,053	19,710	339,262
1*				138,736
2		5,662	4,850	155,243
2*				89,368
3		7,144	8,71527	199,624
3*				70,270
1	60:00	9,705	17,705	340,344
1*				98,324
2		6,253	5,555	159,393
2*				45,012
3		7,083	8,830	233,082
3*				59,084

Quadro 5: Valores Experimentais do Crescimento.

Parâmetro		R^2	a	b	Modelo da curva
Peso seco	1	0.96	1,14	2.36	LOG
	2	0.96	0.65	2.36	LOG
	3	0.95	0.01	1.77	LOG
No. Célula		R_c	a_c	b_c	e_c
	1	0.89	3.60	4.31	LOG
	2	0.91	0.93	1.20	LOG
	3	0.96	1.43	31.95	LOG
Nitrogênio	1	0.06	335.25	0.06	LIN
	2	0.18	159.74	-0.08	LIN
	3	0.91	147.73	0.01	EXP

Quadro 6: Coeficientes de regressão calculados. (R = Coeficiente de correlação; a = Coeficiente linear; b = Coeficiente angular).

Tempo h	PESO SECO						NÚMERO DE CÉLULAS					
	1 g/l	2 g/l	3 g/l	1 g/ 1.h	2 g/ 1.h	3 g/ 1.h	1 10^8	2 10^8	3 10^8	1 10^8 /h	2 10^8 /h	3 10^8 /h
0	0.718	0.517	0.918	0	0	0	0.461	0.461	0.461	0	0	0
0.2	-2.660	-1.350	-2.840				-3.340	-1.000	-1.710			
0.4	-1.030	-0.490	-1.610				-0.350	-0.170	-0.360			
0.6	-0.070	-0.010	-0.900				1.400	0.380	0.430			
0.8	0.610	0.370	-0.390				2.640	0.660	0.990			
1.0	1.140	0.650	0.010	2.65	0.13	0.04	3.600	0.930	1.430	3.14	0.47	0.97
1.2	1.570	0.870	0.330	2.15	1.10	1.60	4.390	1.150	1.780			
1.4	1.930	1.060	0.600	1.80	0.95		5.050	1.340	2.080			
1.6	2.250	1.230	0.830				5.630	1.500	2.340			
1.8	2.520	1.370	1.040				6.140	1.640	2.570			
2.0	2.770	1.500	1.230	1.63	0.85	0.16	6.590	1.760	2.780	2.99	0.83	1.35
2.2	3.000	1.620	1.400			0.75	7.000	1.880	2.960			
2.4	3.200	1.730	1.550			0.70	7.380	1.980	3.130			
2.6	3.390	1.830	1.690			0.65	7.720	2.080	3.290			
2.8	3.570	1.920	1.820			0.60	8.040	2.170	3.430			
3.0	3.730	2.010	1.940	0.96	0.51	0.60	8.340	2.250	3.570	1.75	0.49	0.79
4.0	4.41	2.36	2.45	0.68	0.35	0.51	9.58	2.59	4.13	1.24	0.34	0.56
5.0	4.94	2.64	2.85	0.53	0.28	0.40	10.54	2.86	4.56	0.96	0.27	0.43
6.0	5.37	2.87	3.17	0.43	0.23	0.32	11.33	3.08	4.92	0.79	0.22	0.36
8.0	6.05	3.22	3.68	0.34	0.23	0.26	12.57	3.43	5.48	0.62	0.17	0.28
10.0	6.57	3.50	4.07	0.26	0.09	0.20	13.53	3.69	5.91	0.48	0.14	0.22
12.0	7.00	3.73	4.39	0.22	0.12	0.16	14.32	3.91	6.27	0.40	0.11	0.18
14.0	7.37	3.92	4.66	0.19	0.10	0.14	14.98	4.10	6.57	0.33	0.10	0.15
16.0	7.68	4.08	4.90	0.16	0.08	0.12	15.56	4.26	6.83	0.29	0.08	0.13
18.0												
20.0	8.21	4.36	5.29	0.13	0.07	0.10	16.52	4.52	7.27	0.24	0.07	0.11
22.0												
24.0	8.64	4.58	5.62	0.11	0.06	0.08	17.30	4.74	7.62	0.20	0.06	0.09
26.0												
28.0	9.01	4.78	5.89	0.09	0.05	0.07	17.97	4.93	7.92	0.17	0.05	0.08
30.0												
32.0	9.32	4.94	6.12	0.08	0.04	0.06	18.54	5.09	8.18	0.14	0.04	0.07
34.0												
36.0	9.60	5.09	6.33	0.07	0.04	0.05	19.05	5.23	8.41	0.13	0.04	0.06
38.0												
40.0	9.85	5.22	6.52	0.06	0.03	0.05	19.51	5.35	8.62	0.12	0.03	0.05
42.0												
44.0	10.07	5.34	6.69	0.06	0.03	0.04	19.92	5.47	8.80	0.10	0.03	0.05
46.0												
48.0	10.28	5.44	6.84	0.05	0.03	0.04	20.29	5.57	8.97	0.09	0.03	0.04
50.0												
52.0	10.47	5.54	6.98	0.05	0.03	0.04	20.64	5.67	9.13	0.09	0.03	0.04
54.0												
56.0	10.64	5.63	7.40	0.05	0.02	0.04	20.96	5.76	9.27	0.08	0.02	0.04
58.0												
60.0	10.81	5.72	7.23	0.04	0.02	0.03	21.25	5.84	9.41	0.07	0.02	0.04

Quadro 7: Curvas de crescimento calculadas (peso seco e número de células).

Obs.: 1, 2 e 3 referem-se aos tratamentos 1, 2 e 3 respectivamente.

X_i t (h)	XN_1 (ppm)	Y_i XN_2 (ppm)	XN_3 (ppm)
0	335,25	159,74	147,73
1	335,30	150,67	148,72
2	335,36	159,59	149,73
3	335,42	159,51	150,74
4	335,48	159,44	151,75
5	335,54	159,36	152,78
6	335,60	159,28	153,81
8	335,71	159,13	155,89
10	335,83	158,98	158,00
12	335,94	158,82	160,14
14	336,06	158,67	162,31
16	336,18	158,51	164,51
20	336,41	158,21	169,00
24	336,64	159,90	173,61
28	336,88	157,59	178,34
32	337,11	157,28	183,20
36	337,34	156,98	188,20
40	337,57	156,67	193,33
44	337,81	156,36	198,61
48	338,04	156,05	204,02
52	338,27	155,75	209,59
56	338,50	155,44	215,30
60	338,74	155,13	221,17

Quadro 8: Curvas de Nitrogênio Total. (X_i = abscissa; Y_i = ordenada; XN_1 , XN_2 , XN_3 = Curvas calculadas para os tratamentos 1, 2 e 3 respectivamente.

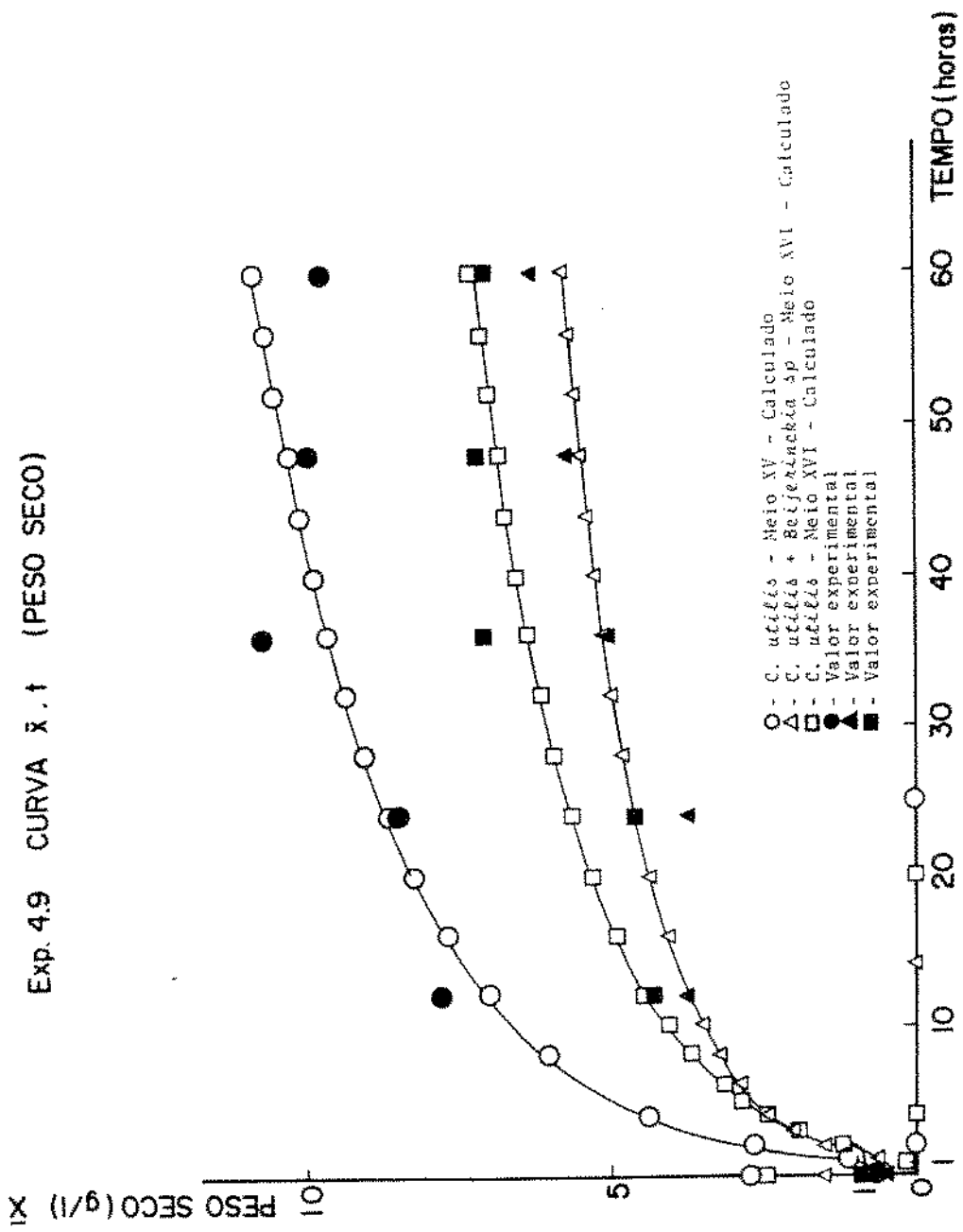


Fig. 30. Curvas calculadas do crescimento de *C. utilis*, Meios XV e XVI, *C. utilis* e *Beijerinckia sp* Meio XVI (Peso Seco), pH inicial 6,0.

Exp. 4.9 CURVA $\bar{x} \cdot t$ (NÚMERO DE CÉLULAS)

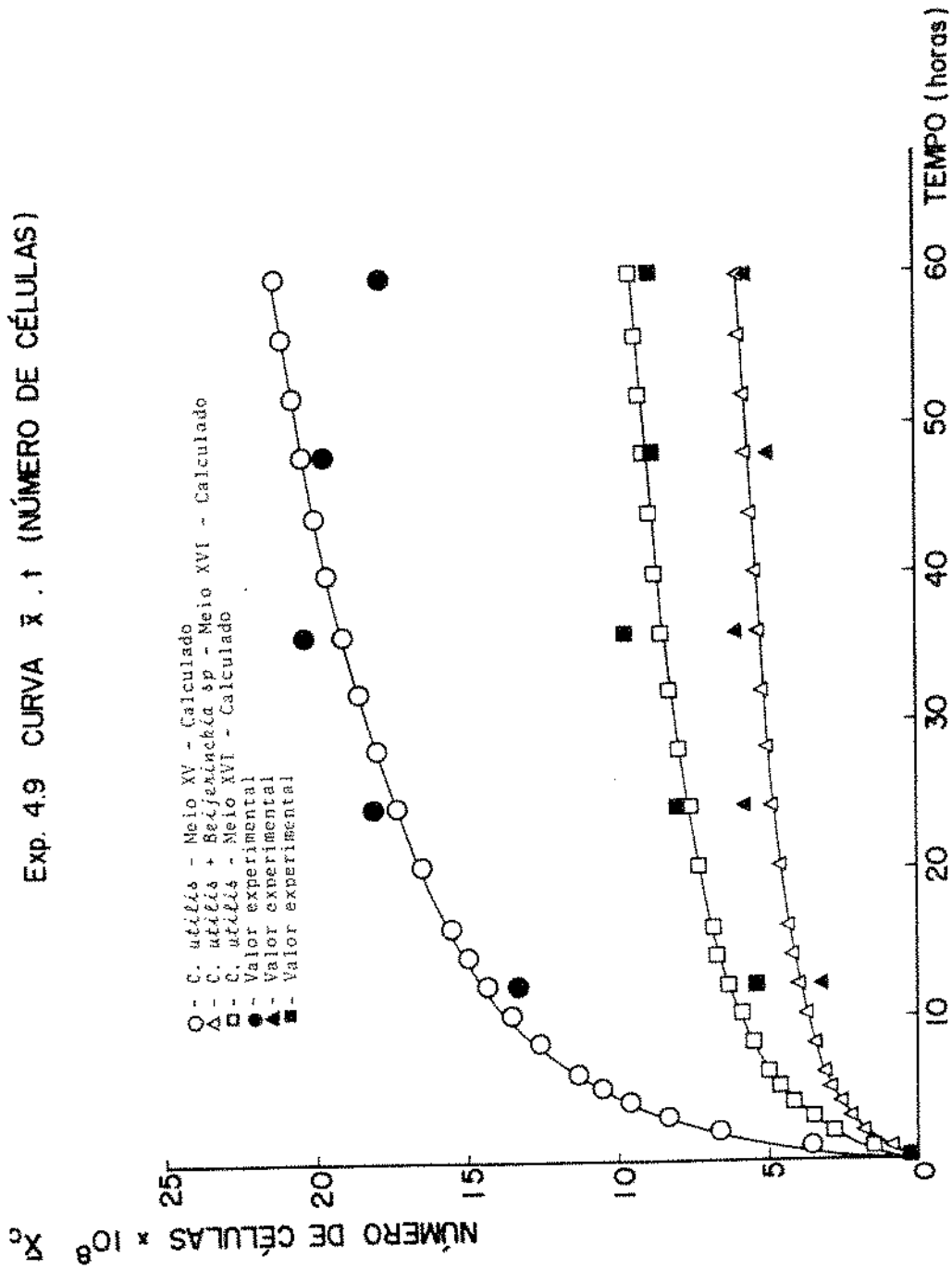


Fig. 31. Curvas calculadas do crescimento de *C. utilis*, em Meios XV e XVI, *C. utilis* e *Beijerinckia* sp Meio XVI, pH inicial 6.0. (Número de células).

Exp. 4.9 - CURVAS $\bar{X}_N \times t$ (NITROGÊNIO)

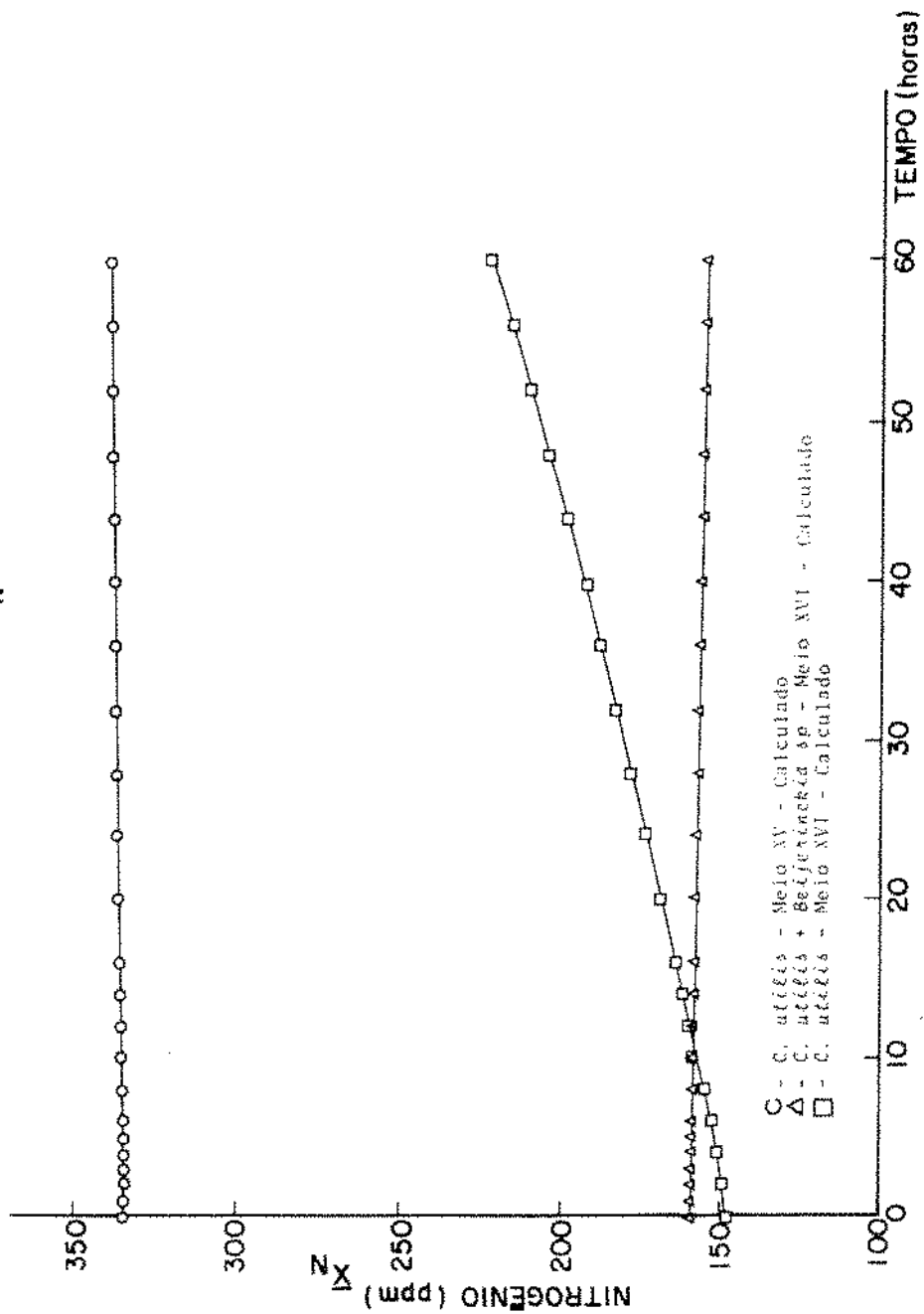


Fig. 32. Curvas calculadas de nitrogênio total, do crescimento de *C. utilis*, Meios XV e XVI, *C. utilis* e *Beijerinckia sp* Meio XVI, pH inicial 6,0.

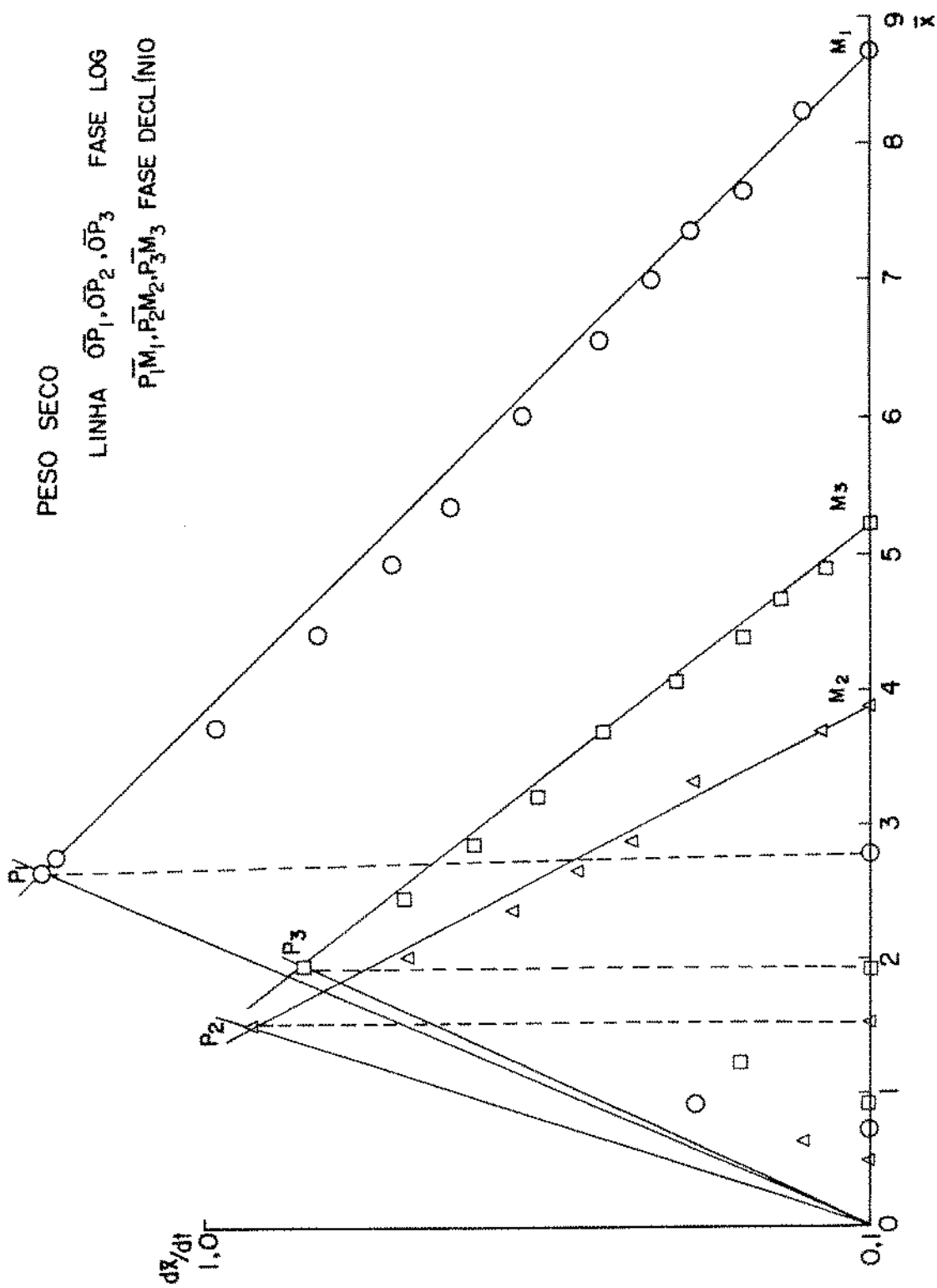


Fig. 33. Estimativa dos parâmetros cinéticos para peso seco.

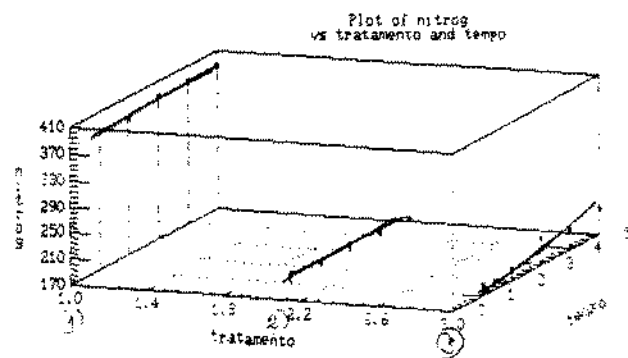
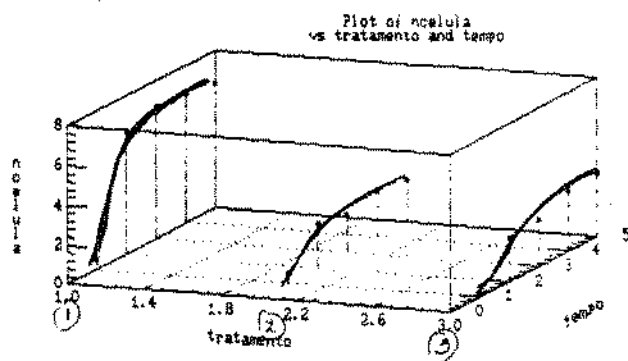
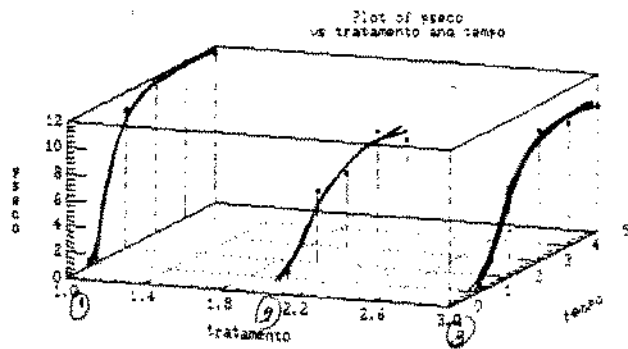


Fig. 34. Curvas de crescimento (Conf. Espacial).

Tratam.	X1 (g/l)	T1 (h)	Xc (g/l)	Tc (h)	Xm (g/l)	Tm (h)	Kx
1	1,0	1,0	2,67	2,0	8,72	25,0	0,271
2	0,6	0,6	1,50	2,0	3,9	14,0	0,563
3	0,7	0,9	1,92	4,0	5,28	20,0	0,305

Quadro 9: Parâmetros cinéticos calculados

1. - PESO SECO:

III. - FASE EXPONENCIAL:

$$\text{Exp. 1. } \bar{X}_1 = 2,67 \cdot \text{Exp. } 0,271 (t-2,0)$$

$$\text{Exp. 2. } \bar{X}_2 = 1,50 \cdot \text{Exp. } 0,563 (t-2,00)$$

$$\text{Exp. 2. } \bar{X}_3 = 1,92 \cdot \text{Exp. } 0,305 (t-4,0)$$

IV. - FASE DECLÍNIO:

$$\text{Exp. 1. } \bar{X}_1 = 2,67 \cdot \text{Exp. } -0,12 \cdot (t-2,0)$$

$$\text{Exp. 2. } \bar{X}_2 = 1,50 \cdot \text{Exp. } -0,35 \cdot (t-2,0)$$

$$\text{Exp. 3. } \bar{X}_3 = 1,92 \cdot \text{Exp. } -0,17 \cdot (t-4,0)$$

2. - NITROGÊNIO:

$$K_N = 1,25 \text{ ppm/h}$$

$$a_1 = 335 \text{ ppm}$$

$$a_2 = 160 \text{ ppm}$$

$$a_3 = 148 \text{ ppm}$$

FASES III E IV:

$$\text{Exp. 1.: } \bar{X}_{N_1} = 335$$

$$\text{Exp. 2.: } \bar{X}_{N_2} = 160$$

$$\text{Exp. 3.: } \bar{X}_{N_3} = 148 \text{ Exp } (1,25 \cdot t)$$

Quadro 10: Equações cinéticas propostas (peso seco e nitrogênio total).

CONCLUSÕES

1. *Beijerinckia sp* e *Azotobacter vinelandii* utilizam o vinhoto suplementado para crescimento e fixação de nitrogênio.
2. A levedura *Candida utilis* tem um aumento significativo no seu crescimento, representado pela sua biomassa, quando em cultura mista com as bactérias fixadoras de nitrogênio.
3. O aumento do nitrogênio total da suspensão de células da cultura mista de leveduras e B.F.N. não depende das fases de crescimento da levedura *C. utilis*, obedecendo a um aumento exponencial simples, durante as fases de crescimento exponencial e de declínio da levedura.
4. O crescimento misto da levedura e das B.F.N. promove um razoável abaixamento da D.B.O. e da D.Q.O. do vinhoto, o que se mostra interessante para um tratamento biológico primário deste resíduo.

5. Observa-se a formação de goma, no crescimento, da *Beijerinckia* sp e do *Azotobacter vinelandii* em vinhoto suplementado.
6. O crescimento com levedura eleva o pH do vinhoto suplementado para além de 7.0.

SUGESTÕES E RECOMENDAÇÕES

1. O consumo de substâncias presentes no vinhoto, tais como ácidos orgânicos, sais de potássio, etc, com a produção de uma biomassa final passível de ser utilizada de várias maneiras, além de promover o abaixamento da D.B.O. e D.Q.O. do sobrenadante, permite o seu retorno à lavoura sem que provoque problemas de desequilíbrio no solo.
2. A *Beijerinckia* sp por exemplo, está presente na rizosfera da soqueira da cana-de-açúcar, o que aponta a possibilidade do seu retorno à lavoura como fertilizante biológico e inoculante.
3. Existe a possibilidade do aproveitamento da massa celular na composição de rações e outros, resultando um sobrenadante com a carga poluidora consideravelmente diminuída.
4. Existe ainda a possibilidade deste crescimento misto em instalações já existentes de tratamento de resíduos industriais, tipo lodo ativado e outros, promovendo um tratamento rápido com retorno à lavoura e/ou recuperação da biomassa produzida a um custo acessível em escala maior.

5. Não podemos afirmar que o nitrogênio utilizado para promover o aumento celular das leveduras se deva à excreção de substâncias nitrogenadas ou à morte das B.F.N., com vazamento de substâncias intracelulares no meio. Seriam necessários outros estudos visando-se observar estes mecanismos.

6. É possível também estudar as possibilidades de se produzir gomas a partir das B.F.N., utilizando-se o vinhoto como substrato.

7. Finalmente sugere-se o estudo de parâmetros em fermentadores de cultura submersa de pequenos volumes e a ampliação de escala, visando-se a adequação do processo para uma escala piloto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBOTT, B.J. and CLAMEN, A. The relationship of substrate, growth rate, and maintenance coefficient to single cell protein production. *Biotechnology and bioengineering* XV: 117-127, 1973.
2. ACKBELL, B.A.C. and JONES, C.W. The respiratory sistem of *Azotobacter vinelandii*. 2 - Oxygen effects. *European Journal of Biochemistry*, 28: 29-35, 1971.
3. ADMASSU, W.; KORUS, R.A. and HEIMSCH, R.C. Two-stage continuous fermentation of *Saccharomycopsis fibuligera* and *Candida utilis*. *Biotechnology and Bioengineering*. XXV: 2641-2651, 1983.
4. AIBA, S.; HUMPHREY, A.E.; MILLIS, N.F. *Biochemical Engineering*, 2nd edition (University of Tokio press - Tokio), 1973.
5. ALLISON, R.M. and BURRIS, R.H. KINETICS of Fixation of Nitrogen by *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.* 224: 351-364, 1957.

6. ALMEIDA, Jr. Composição, proporção e aplicação da vinhaça. III Semana de fermentação alcóolica. Fermentação do caldo de cana. I. Zimotécnico da ESALQ - USP - 1ª Ed. 2: 289-302, 1962.
7. ANGELIS, D.F. DE; KIYAN, C.; CORSO, C.R. e TAUK, S.M. Emprego de leveduras em culturas puras e mistas objetivando o aproveitamento de vinhaça. Brasil Açucareiro, 6: 17-22, 1979.
8. A.O.A.C. - (Association of Official Analytical Chemists. Official methods of the official analytical chemists, 13th edition - W. Horwitz Editor, 1980.
9. ARAÚJO, N.Q.; VISCONTI, A.E.S.; CASTRO, H.F.; SILVA, H.G.B.; FERAZ, M.H.A.; FILHO, M.S. Produção de Biomassa fúngica de vinhoto. Brasil Açucareiro (6): 35-49, 1976.
10. ARAÚJO, N.Q.; VISCONTI, A.E.S.; ESTEVES, A.M.L.; BAGGIO, C.A.; CASTRO, H.F.; SILVA, H.G.B.; FERAZ, M.H.A.; FILHO, M.S.; REIS, R.F.; SCHNEIDERMAN, V.M.S. e ALMEIDA, W.R. Novas perspectivas para o tratamento microbiológico do vinhoto. Boletim informativo do INT. 19: 3-8, 1977.
11. ARIS. R. The optimal design of chemical reactors (Academic Press, New York), 1961.
12. AUTRET, M. and LE ROUX, J.P. Note on utilization of yeasts for Human consumption. Proteins from Hydrocarbons, de Pontanel G. Ed., Academic Press, New York, 129, 1973.

13. AZEREDO, D.F. e MANHÃES, M.S. Efeitos da aplicação de vinhaça em cana-soca, no Estado do Rio de Janeiro. Campos. IAA/PLANALSUCAR - COESTE, 1978. 12 p. (Congresso Nacional da STAB, 1, Maceió), 1979.
14. BALLANDREAU, J. Activité nitrogenasique dans la rhizosphère de quelques graminées. These de docteur en Sciences Naturelles. Nancy, France, 1975.
15. BALLANDREAU, J. and KNOWLES, R. In Interactions Between plant roots and microorganisms (Dommergues, Y.; and Krupa, S.; EDS) pp. 000-000, Elsevier Co.; Holland, (in press), 1971.
16. BAUCHOP, T. and ELSDEN, S.R. The growth of microorganisms in relation to their energy supply. J. Gen. Microbiol. 23: 457-469, 1960.
17. BECKING, J.H. Nitrogen fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* in South African Soils. Plant and Soil II: 193-206, 1959.
18. BECKING, J.H. Studies on nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia*. I. Geographical and Ecological Distribution in soils. Plant and soil XIV (1): 49-81, march, 1961.
19. BECKING, J.H. Studies on the nitrogen-fixing bacteria of the genus *Beijerinckia*. II - Mineral nutrition and resistance to high levels of certain elements in relations to soil type. Plant and soil XIV, (4): 297-323, july. 1961.

20. BERG, T.G.O. and LIUNGGREN, B. The rate of growth of a single yeast cell., *Biotechnol. and Bioeng.* XXIV: 2739-2741, 1982.
21. BITTENCOUT, V.C.; CASTRO, J.B. DE; FIGUEIREDO, A.A.M.; PAIXÃO, A.C.S. e POLLI, D.M. Composição da vinhaça. *Brasil Açucareiro*, 92 (4): 25-36, 1978.
22. BORZANI, W. and VAIRO, M.L.R. Determination of the volume fraction of yeast cells in a sediment or in a suspension. 247-252, 1982.
23. BOYER, R.R. and DEDMOND, M.A. Effect of chemical modification of cellulose on the activity fo a cellulose from *Aspergillus niger*. *Biotechnology and bioengineering*, 15: 1311-1319, 1983.
24. BRESSANI, R. The use of yeast in human foods, (In *Single-Cell protein*, Mateles, r.l. and Tannembaum, S.R.). Ed. Mit: Press, Cambridge, 90, 1968.
25. BROWN, D.E. Em methods in microbiology (J.R. Ribbons, Ed.) Academic Press, London. 2: 125, 1970.
26. BROWN, S.W.; OLIVER, S.G.; HARRISON, D.E.F. and RIGHELATO, R.C. Ethanol inhibition of yeast growth and fermentation. Diferences in the magnitude and complexity of the effect. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol*, 11: 151-155, 1981.

27. BUNKER, H.S. Sources of single-cell protein: perspective and prospect. Single-Cell protein, (Mateles, R.I. e Tannenbaum, S.B. eds) The Mit Press, 67-78, 1968.
28. BURMA, D.P. and BURRIS, R.H. Kinetics of Ammonia utilization by *Azotobacter vinelandii*. J. Biol. Chem. 225: 287-295, 1957.
29. BURMA, D.P. and BURRIS, R.H. Metabolism of nitrogen by cell free preparations from *Azotobacter vinelandii*. J. Biol. Chem. 225: 723-733, 1957.
30. BURNS, J.M. and BAKER, D.H. Assessment of the quality of biologically available phosphorus in yeast RNA and single-cell protein. Poult. Sci. 55: 2447, 1976.
31. BURRIS, R.H. Distribution of isotopic nitrogen in *Azotobacter vinelandii*. J. Biol. Chem. 143: 509-577, 1942.
32. CALDERBANK, P.H. Em: Biochemical and biological engineering science (N. Blakebrough, ed.) Academic Press, London, 1: 101, 1967.
33. CALDERBANK, P.H. Physical rate processes in industrial fermentation - Part I. Trans. Instn. Chem. Eng. 36: 443-463, 1958.
34. CALDERBANCK, P.H. Physical rate processes in industrial fermentation - Part II. Trans. Instn. Chem. Eng. 37: 173-185, 1959.

35. CAMHI, J.D. Tratamento do vinhoto subproduto da destilação de álcool. Brasil Açucareiro (1): 18-23, julho, 1979.
36. CAMPÊLO, A.B. e DOBEREINER, J. Ocorrência de *Derxia* sp. em solos de alguns estados brasileiros. Pesq. Agropec. Bras. (5): 327-332, 1970.
37. CAMPOS, M.P. A situação de Campos em relação ao vinhoto. A utilização deste efluente de destilaria na obtenção de gás metano. Impressões de viagem à Austrália. Brasil Açucareiro 6: 40-42, 1979.
38. CANTARELLI, P.R. e CARUSO, J.G.B. Caldo de cana como substrato na produção de levedura alimentar. Brasil Açucareiro. 6: 83-85, 1968.
39. CESAR, M.A.A.; DELGADO, A.A. e GABAN, L.C. Aumento do nível de amido e de potássio no caldo de cana, decorrente da aplicação sistemática de vinhaça no solo. Brasil Açucareiro. 92 (1): 24-29, 1978.
40. CHANG, C.T. and YANG, W.L. Aerley of feed yeast production from molasses distillery stillage. Taiwan sugar, September through October, 200-205, 1973.
41. CHAYKIN, S. In biochemistry laboratory technique. J. Wiley. New York, 1966.
42. CHEN, S.L. Energy requirement for microbial growth. Nature 202: 1135-1136, 1964.

43. COCHRAN, W.G. and COX, G.M. Experimental designs. 2nd ed. J. Wiley, New York, 1957.
44. COLET, J.T. Fertilização com vinhaça da usina Santa Adelaide. Brasil Açucareiro, 92 (5): 38-50, 1978.
45. CONAGIN, A. Princípios de Técnica Experimental e Análise Estatística - Apostila do Instituto Agronômico - SP. 1957.
46. CRUZ, M.R.M. Estudos genéticos e produção de proteína unicelular em leveduras do gênero *Torula*. Dissertação de Tese de Mestrado - ESALQ, USP. 1977.
47. DABBAH, R. Protein from microorganisms. Food Technology 24: 35-42, 1970.
48. DALTON, H. and POSTGATE, J.R. Effect of oxygen on growth of *Azotobacter chroococcum* in batch and continuous cultures. J. Gen. Microbiol. 54: 463-473, 1969.
49. DAVY, C.A.E.; WILSON, D. and LYON, J.C.M. Commercial production of feed yeast from carbohydrate waste. Advances in biotechnology, Vol. 2 (Mood-young, M. and Robinson, C.W. Eds) Pergamod Press, Toronto, 343, 1981.
50. DEINDOERFER, F.H. Fermentation kinetics and model process. Adv. Appl. Microbiol. 2: 321, 1960.
51. DEPARTAMENTO TÉCNICO DA COPERSUCAR - Aproveitamento da vinhaça: viabilidade. Técnico - Econômica. março 1978.

52. DERX, H.G. *Beijerinckia*, A new genus of nitrogen-fixing bacteria occurring in tropical soils. Proc. Kon. Ned. Akad. Wetenschap. Proc. 53: 140-147, 1950.
53. DERX, H.G. Further researches on *Beijerinckia*. Ann. Bogoriensis, 1: 1-11, 1950.
54. DIMMELING, W. and SEIPENBUSCH, R. Feedstocks for SCP production. Abstracts of papers, fifth Int. Ferm. Symp., Dellweg, H.; Ed. Westkeuz-Druckerei und verlag, Berlin, 201, 1976.
55. DOBEREINER, J. Nitrogen fixing bacteria of the genus *Beijerinckia derx* in the rhizosphere of sugar cane. Plant and soil, 14: 211-217, 1961.
56. DOBEREINER, J. Nitrogen fixation grass-bacteria associations in the tropics. In: Isotopes in biological dinitrogen fixation IA - EA, AG - 92/4. pp. 51-69, 1978.
57. DOBEREINER, J. Non-symbiotic nitrogen fixation in tropical soils. Pesquisa Agropecuária Brasileira. 3: 1-6, 1968.
58. DOBEREINER, J. Sobre a ocorrência de "*Beijerinckia*" em alguns Estados do Brasil. Rev. Brasil. Biol. 19 (2): 151-160, agosto 1959.
59. DOBEREINER, J. and DE CASTRO, A.F. Ocorrência e capacidade de fixação de nitrogênio de bactérias do gênero *Beijerinckia* nas séries de solos da área territorial do Centro Nacional de Ensino e Pesquisas Agronômicas. Bol. Inst. Ecol. Exp. Agr. 16: 18 pp., 1955.

60. DOBEREINER, J. and RUSCHEL, A.P. Uma nova espécie de *Beijerinckia*. *Rev. Biol.* 1: 261-272, 1958.
61. DOMMARGUES, Y. Distribution des *Azotobacter* e des *Beijerinckia*. Dans les principaux types de sol de l'ouest Africain. Annales de L'Institut Pasteur, 105 (2): 181-186, 1963.
62. DOMMARGUES, Y. et MUTAFTSCHIEV, S. Fixation Synergique de l'azote atmosphérique dans les sols tropicaux. Annales de L'Institut Pasteur, 109 (3): 112-120, 1965.
63. DOBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em gramíneas tropicais. *Interciência* - 4, (4): 200-205, Jul-Ago, 1979.
64. DOBEREINER, J. Fixação de nitrogênio em gramíneas. *Rev. Bras. Cie. Solo*, 1: 1-9, 1976.
65. DOBEREINER, J. Further research on *Azotobacter paspali* and its variety specific occurrence in the Rhizosphere of *Paspalum notatum* Flugge. *Central Bl. Bact. Parasitenk, ABT II*, 124: 224-230, 1970.
66. EDOZIEN, J.C.; UDO, U.V.; YOUNG, V.R. and SCRIMSHAW, N.S. Effects of high levels of yeast feeding on uric acid metabolism of young men. *Nature* 228: 180, 1970.
67. ELNAWAWY, A.S. and FOUAD, M.A. Comparative study on SCP production from molasses, vinnasse or bakers yeast effluent. *Rev. Microbiol.* 6 (2): 42-46, 1975.

68. ELNAWAWY, A.S. and FOUDA, M.A. Utilization of egyptian molasses in the production of single-cell protein (SCP) - a comparative study on three different yeasts. Agric. Res. Rev., Cairo, 51: 207-210, 1973.
69. ESENER, A.A.; KOSSEN, N.W.F. and ROELS, J.A. In water treatment and utilization. M. Moo-young ed., (Pergamon, New York) 2: p. 165, 1982.
70. ESENER, A.A.; ROELS, J.A. and KOSSEN, N.W. Theory and applications of Unstructures Growth Models: Kinetic and Energetic Aspects. Biotechnol an Bioeng., XXV: 2803-2841, 1983.
71. ESENER, A.A. Engineering study of bacterial kinetics and energetics. PhD Thesis. Delft University of Technology. Delft, the Netherlands. 1981.
72. FEEMA - Método de Determinação da Demanda Química de Oxigênio - MI 440 R1: 1-13, 1981.
73. FORAGE, A.J. and RIGHLELATO, R.C. Biomass from Carbohydrates. In Economic Microbiology. Vol. 4, Rose, A.H., Ed., Academic Press, New York, 289, 1979.
74. FOSTER, J.W. Chemical nature of the mold mycelium, in chemical activities of fungi. Academic Press, New York, 76, 1949.
75. FREEDRICKSON, A.G.; MEGEE, R.D. and TSUCHIYA, H.M. Mathematical models for fermentation processes. Adv. Appl. Microbiol. 13: 419, 1971.

76. GADEN, E.L. Jr. Fermentation Kinetics and productivity. Chem. & Ind., 7: 154, 1955.
77. GAMBALE, V. Efeito da adição de K_2SO_4 em cultura de leveduras em vinhaça. Brasil Açucareiro. 1: 35-37, 1979.
78. GAMBORG, O.L. and NOLL, F.B. Plant prototype fusion and hybridization, in genetic engineering for nitrogen fixation, In, Hollander, A.; Burris, R.H.; Day, P.R.; Hardy, R.W. F.; Helinski, D.R.; Lamborg, M.R.; Owens, L. and Valentine, R.C. Eds. Plenum Press, New York, 299, 1977.
79. GLÓRIA, N.A.; SANTA ANA, A.G. e BIAGI, E. Composição dos resíduos de usinas de açúcar e destilarias. Brasil Açucareiro. 81(6): 78-87, 1973.
80. GLÓRIA, N.A. e PEIXE, C.A. Aplicação da vinhaça na cultura de cana-de-açúcar. Usina Costa Pinto - Relatório, 1976.
81. GLÓRIA, N.A. Emprego de resíduos na irrigação. II Seminário. II Seminário sobre cultivo de cana-de-açúcar. Cooperativa Central dos Produtores de Açúcar e Álcool do Estado de SP. 1974.
82. GLÓRIA, N.A. Emprego da vinhaça para fertilização. Piracicaba, Codistil 310, 1976.
83. GOMES, P. Curso de Estatística Experimental. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz - USP - São Paulo, 1966.

84. GREENE, R.A. The effect of temperature upon the nitrogen fixation by Azotobacter. Soil Sci. 33: 153-161, 1932.
85. HAMAD, FARES, I. La Fixation de L'Azote la Rhizosphère du Riz. These de Docteur es sciences naturelles. Nancy, France, 1976.
86. HAMER, G. Wall growth and its significance in large fermenters used for the cultivation of single-cell microorganisms. Biotechnol. Bioeng. Symp. 4, 565, 1973.
87. HEDENSKOG, G. and MOGREN, H. Some methods for processing of single-cell protein. Biotechnology and bioengineering XV: 129-142, 1973.
88. HERNANDEZ, E. and JOHNSON, M.J. Energy supply and cell yield in aerobically growth microorganism. Journal of Bacteriology, 94: 996-1001, 1967b.
89. HIMMENBLAU, D.M. Process Analysis is by Statistical Methods. G. Wiley, New York, 1970.
90. HISS, H. and BORZANI, W. A generalised kinetic model for the study of microbial growth. Biotechnology and Bioengineering. XXV: 3079-3087, 1983.
91. HIXON, A.W. and GASEN, E.L. Oxygen transfer in submerged fermentation. Ind. Eng. Chem. 42: 1792-1801, 1950.
92. HORNER, C.K. and BURCK, D. Magnesium, Calcium and iron requirements for growth of Azotobacter in free and fixed nitrogen. J. Agr. Research, 48:981-995, 1934.

93. HORNER, C.K.; BURCK, D.; ALLISON, F.E. and SHERMAN, M.S. Nitrogen fixation by Azotobacter as influenced by molybdenum and vanadium. J. Agr. Research, 65: 173-193, 1942.
94. HOSPODKA, I. Oxygen absorption rate-controls feeding of substrate into aerobic microbial cultures. Biotechnol. and Bioeng. 8: 117-134, 1966.
95. HUNKOVÁ, Z. and FENCL, Z. Toxic effects of fatty acids on yeast cells: Dependence of inhibitory effects on fatty acid concentration. Biotechnol. Bioeng. 19: 1623-1641, 1977.
96. JENSEN, H.L. The influence of molybdenum, calcium, and agar on nitrogen fixation by *Azotobacter indicum*. Proc. Linnæan Soc. N. S. Wales, 72: 299-310, 1948.
97. JENSEN, H.L. The magnesium requirements of *Azotobacter* and *Beijerinckia*, with some additional notes on the latter genus. Acta Agr. Scand. 4: 224-236, 1954.
98. KARAKI, I.; NISHIOKA, S. e KONISHI, K. Yeast production from alcohol distillation shop of cane molasses. Hakko Kyokai-shi, 26 (4): 173-186, 1968.
99. KARAKI, I.; NISHIOKA, S. e KONISHI, K. Yeast production from alcohol distillation shop cane molasses VII. Hakko Kyokai-shi. 26 (6): 263-269, 1969.

100. KIHMBERG, R. The microbe as a source of food. : 427, 1972.
101. KLUYVER, A.J. and BECKING, J.H. Some observations on the nitrogen- fixing bacteria of the genus *Beijerinckia* detx. Ann. Acad. Sci. Fennicae, Ser. A. II, 60: 367-380, 1955.
102. KNOWLES, R. Living Bacteria. Limitations and potentials for biological nitrogen fixation in the tropics. In Döbereiner, J.; Burris, R.H.; Hollaender, A. ed Plenum Press - New York and London, 1978.
103. KONO, T. and ASAI, T. Kinetics of fermentation processes. Biotech. Bioeng. 11: 293, 1969.
104. KUJALA, P.; HULL, R.; ENGSTROM, F. and JACKMAN, E. Alcohol from molasses as a possible fuel and the economic of distillery effluent treatment. Sugar y azucar - 28-39, march, 1976.
105. LAMO, P.R.; MENEZES, T.J.B. Bioconversão da vinhaça para a produção fúngica. (9): 281-313, 1978.
106. LE FRANÇOIS, L. Production de proteines alimentaires des levures de vinasse. Industries Agricoles et alimentaires 2^{eme} Année, (3): 187-192, 1955.
107. LE FRANÇOIS, L. De valorisation d'eaux residuales au moyen de la culture de levure-aliment. Industr. Alim. Agr. Paris. 78: 291-298, 1961.

108. LEME Jr., J. Leveduras Industriais, Ferm. Alcoólica. Inst. Zimotécnico da USP - Piracicaba, II: 305-327, 1960.
109. LEME Jr., J. e BORGES, J.M. Análise do caldo. In: Açúcar-de-cana. Viçosa, Univ. Rur. Est. M.G. p: 211-256, 1965.
110. LEMME, S.A.; HEIMSCH, R.C. and EDWARDS, L.L. Optimizing continuous production of *Candida utilis* and *Saccharomyces fibuligera* on potato processing waste water. Appl. environ. microbiol. 37: 227-232, 1979.
111. LEES, H. and POSTGATE, J.R. The behaviour of *Azotobacter chroococcum* in oxygen and phosphate - limited chemostat culture. Journal of General Microbiology, 75: 161-166, 1973.
112. LEVENSPIEL, O. In: Chemical reaction engineering. (J. Wiley, New York), 1962.
113. LIMA, O.G. Produção Microbiológica de proteínas. Revista de Química Industrial. Os Resíduos da Indústria do Alcool de Melado de Cana como Matéria Prima. 19-24. Março, 1964.
114. LIMA, O.G. Adaptação da *Candida utilis* em vinhaça. Separata dos anais da Escola Superior de Química. 1 (1): 67-82, 1950.
115. LINDBLOM, M. The influence of alkali and heat treatment on yeast protein. Biotechnol. Bioeng., 16: 1945, 1974.

116. LITCHFIELD, J.H.; VELY, V.G. and OVERBECK, R.C. Nutrient content of morel mushroom mycelium: Amino-acid composition of the protein. *J. of Food Science* 28: 741, 1963.
117. LUEDEKING, R. and PIRET, E.L. A kinetic study of the lactic acid fermentation. Bath process at controlled pH. *J. Biochem. Microbiol. Tech. and Eng.* 1: 393, 1959.
118. LUYBEN, K.C.A.M. and TRAMPER, J. Optimal design for continuous stirred tank reactors in series using michaelis-menten kinetics. *Biotechnol. and Bioeng.* XXIV: 1217-1220, 1982.
119. MACHEK, F.; FENEL, Z.; BERAN, K.; BEHALOVA, B.; SILLINGER, V.; and KEJWAR, J. Production of native proteins from yeasts. *Biotechnol. Bioeng.* 4: 977, 1974.
120. MAGRO, J.A. Uso da vinhaça em cana-de-açúcar na usina da pedra serrana. *Brasil Açucareiro* (4): 40-49, outubro - 1978.
121. MARIC, V.; EINSELE, A. and FIECHTER, A. Respiratory activity and growth kinetics of Candida yeasts related to carbon sources and available energy. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 8: 157-165, 1979.
122. MARTINI, 4. La proteina Di Lievitonella Alimentazione umana. Estrato Dalla Revista Seta - ano III. 4: 203-207 (1973).

123. MATELES, R.I. and TANNENBAUN, S.R. Single-cel Protein. Protein Symposium - Economic Botany - 42-50. 1968.
124. MAXON, W.D. In kinetics of fermentation process. Biotech. Bioeng. 11: 293, 1969.
125. MEADE, G.P.; ed. Spencer - meade cane sugar Handbook. 9th. ed. John Wiley & Sons. New York. Chap 1 and 3, 1963.
126. MENEZES, T.J.B. Aspectos genéticos da seleção e aplicação de Microrganismos em fermentações industriais. Ciência e Cultura, 25 (4): 316-321, 1973.
127. MENEZES, T.J.B.; DUCHINI, L.A. e FIGUEIREDO, J.B. Produção em laboratório de proteína fúngica em bagaço de cana. Revista Brasileira de Tecnologia, 7: 439-446, 1976.
128. MENEZES, T.J.B. e LAMO, P.R. de. Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos, 47: 37, 1976.
129. MENEZES, T.J.B.; LAMO, P.R. de e ARAKAKI, T. Coletânea do ITAL. 16: 83, 1978.
130. MENGATTI, L. Isolamento e caracterização de mutantes de levedura rica em metionina. Pader - ITAL - Campinas - 40 pp. 1980.

131. MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DA DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXIGÊNIO
- DBO FEEMA - MF RI: 01-14, 1981.
132. MEYRATH, J. and BAYER, K. Biomass from whey. (In Economic Microbiology) vol. e. Microbial Biomass. Academic Press, New York, 207, 1979.
133. MONOD, J. Recherches sur la croissance de cultures bactériennes. 2nd ed. (Hermann, Paris), 1982.
134. MONTEIRO, C.E. Brazilian Experience with disposal of waste from the cane sugar and alcohol Industry. Process Biochemistry - 33-41, nov. 1975.
135. MORESI, M. and MARCHIONNI, G. Preliminary Study on the operative variables of SCP production from grape msut. European J. of Applied microbiology and biotechnology. 16: 204-207, 1982.
136. MORESI, M. and SEBASTIANI, E. Optimization of whey fermentation in a shaken-flask fermenter. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 8: 63-71, 1979.
137. MORETON, R.S. Growth of *Candida utilis* on enzymatically hydrolyzed potato waste. J. Appl. Microbiol. 44:373-382, 1978.

138. MORITZ, V. Mecanismo e cinética de utilização de n-Alcanos por leveduras. Tese Livre-Docência, Escola de Química. UFRRJ. Rio de Janeiro. 1969.
139. MOSS, F.J. and TCHAN, Y.T. Studies of N-Fixing bacteria VII. Cytochromes of *Azotobacteriaceae*. Proc. Linn. Soc. N.S.W. 83, 161, 1958.
140. MULDER, E.G. Molybdenum in relation to growth of nigher plants and microorganism. Plant and soil, 5, 368-415, 1954.
141. NAGAI, S. and AIBA, S. Knetics of yield factor as affected by dissolved oxygen in a chemostat culture of *Azotobacter vinelandii*. Symposium of International Fermentation, 4 (in the press) 1972.
142. NAGAI, S. and AIBA, S. Reassessment of maintenance and energy uncoupling in the growth of *Azotobacter vinelandii*. J. of gen. Microbiol. 73: 531-538, 1972.
143. NAGAI, S.; NISHIZAWA, Y. and AIBA, S. Energetics of growth of *Azotobacter vinellandii* in a glucose - Limited chemostat culture. Journal of General Microbiology, 59: 163-169, 1969.
144. NAGAI, S.; NISHIZAWA, Y.; ONOBERA, M. and AIBA, S. Effect of dissolved oxygen on growth yield and aldolase activity in chemostat culture of *Azotobacter vinelandii*. Journal of General microbiology, 66: 197-203, 1971.

145. NAKAMURA, K.D. and SCHLENK, F. Stability of *Candida utilis* Cells and spheroplasts toward gravitational forces. *J. Bacteriol.* 116, 1472, 1973.
146. NAOMICHI, N. and SHIRO, N. Single-Cell protein Production from Mandarin Orange Peel. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 11: 156-160, 1981.
147. NEISH, A.C. Analytical methods for bacterial fermentations *Nat. Research Council Canada, Saskatoon, Bull. n° 2952*, 1952.
148. NISHIZAWA, Y.; NAGAI, S. and AIBA, S. Effect of dissolved oxygen on Electron transport system of *Azotobacter vinelandii* in glucose - Limited and oxygen-limited chemostat cultures. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 117: 131-140, 1971.
149. NORRIS, J.R. and JENSEN, H.L. Calcium requirements of *Azotobacter*. *Nature*, 180: 1493-1494, 1957.
150. NYHOLM, M. A mathematical model for microbial growth under limitation by conservative substrates. *Biotechnol. Bioeng.* 18: 1043-1056, 1976.
151. OHNISHI, T.; KAWAGUCHI, K. and MAGIHARA, B. Preparation and some properties of yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* 241: 1797-1806, 1966.
152. OLSON, B.H. and JOHNSON, M.L. Factors producing high yeast yields in synthetic media. *J. Bacteriol.* 57: 235-246, 1949.

153. ONG, S.L. Least-squares estimation of batch culture kinetic parameters. *Biotechnol. and Bioeng.* XXV: 2347-2358, 1983.
154. ORLANDO, F.J.; SOUZA, J.C. e ZAMBELLO, Jr. E. Aplicação de vinhaça em soqueiras de cana-de-açúcar, economicidade do sistema caminhões - tanque. *Boletim Técnico. Planalsucar. Piracicaba-2*, (5): 1-35, ste. 1980.
155. PÁCA, J. Effect of multistage ethanol feeding on growth and physiological characteristics of *Candida utilis* in a multi-stage tower fermentor. *Enzyme microbiol. Technol.* 3: 123-128, 1981.
156. PÁCA, J. Comparison of Ethanol Feed-type on yeast growth at various PO_2 Levels. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 15: 9-13, 1982.
157. PÁCA, J. and GRÉGR, V. Growth characteristics of *Candida utilis* in a multistage culture system. *Enzyme Microbiol. Technol.* 1: 100-106, 1979.
158. PÁCA, J. and GRÉGR, V. Effect of PO_2 growth and physiological characteristics of *Candida utilis* in a multistage tower fermentor. *Biotechnol. Bioeng.* 21: 1827-1843, 1979.

159. PARKER, C.A. Effect of oxygen on the fixation of nitrogen by *Azotobacter*. *Nature, Lond.* 173, 780, 1954.
160. PARKER, C.A. Non-symbiotic nitrogen fixing bacteria in soil. III Total Nitrogen changes in a field soil. *J. Soil. Sci.* 8: 48-59, 1957.
161. PATHAK, A.N. The effect of temperature upon nitrogen fixation by *Azotobacter*. *Proc. Bihar Acad. Agr. Sci.* 2/3, 109-112, 1954.
162. PATURAN, J.M. Characteristics of Bagasse. In by products of the cane and sugar Industry. Paturan, J.M. Ed., Elsevier, New York. 25, 1969.
163. PAUL, E.A. In environmental biogeochemistry, vol. 1. Carbon nitrogen, phosphorus, Sulfur and selenium cycles. (Nriagu, J.O. ed) pp 225. Ann Arbor Science, Michigan, 1976.
164. PHILLIPS, D.H. e JOHNSON, M.J. Aeration in Fermentations. *Journal of Biochemical and microbiological Technology and Engineering*, 3: 277-309, 1961.
165. POLLARD, R. and SHEARER, C.J. Aplicação de conceitos de Engenharia Química ao dimensionamento de fermentadores. *The Chem. Eng.* 106-110, Fev. 1977.
166. PRADELLA, J.G.C. Contribuição ao estudo da cinética do crescimento celular e acúmulo de lipídios por *Rhodotorula gracilis*. Tese de Mestrado. FEA - UNICAMP, 1980.

167. PRIOR, B.; KILIAN, S. and LATEGAN, P. Growth of *Candida utilis* on ethanol and isopropanol. Arch. Microbiol. 125: 133-136. 1980.
168. QUINNELL, C.M. Observations on the physiology of *Azotobacter indicum*. J. Bacteriol. 73: 688-689, 1957.
169. REICH, G.T. Production of carbon and potash from molasses distillery, Stillage. Trans. Amer. Inst. Chem. Engi. vol XLI, 233, 1945.
170. RENNIE, R.J.; FREITAS, J.R.; RUSCHEL, A.P. and VOSE, P.B. Isolation and identification of N₂-Fixing bacteria associated with sugar cane (*Saccharum* sp). Can. J. Microbiol. 28: 462-467, 1982.
171. REUB, M.; JOSIC, D.; POPOVIC, M. and BRONN, W.K. Viscosity of yeast suspensions. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol 8: 167-175, 1979.
172. RHA, C.K. Utilization of single-cell protein for human food, Single-Cell protein II: (Tannembaum, S.R. and Wang, D.I.C., Eds) Mit Press, Cambridge, 576. 1975.
173. RIGHELATO, R.C. In fungal walls and hyphal growth. J.H. BURNETT and A.P.J. Trinci, eds p. 385 (Cambridge University. Cambridge). 1979.
174. RIGHELATO, R.C. In the filamentous fungi. J.E. Smith and D.R. Berry. Eds. vol. 1 (Edward Arnold, London) p. 79. 1975.

175. RODELLA, A.A. e FERRARI, S.E. A composição da vinhaça e efeitos de sua aplicação como fertilizante na cana-de-açúcar. *Brasil Açucareiro*, 90 (1): 6-13, 1977.
176. RODELLA, A.A.; PARAZZI, C. e CARDOSO, A.C. Composição de vinhaça. *Brasil Açucareiro*, Rio de Janeiro, 96 (4): 25-28. Out. 1980.
177. ROLZ, C. Utilization of cane and coffee processing by products as microbial protein substrates, Single-cell protein. II. Tawnembaum, S.R. and Wang, D.I.C., eds. *Mit Press, Cambridge*, 273, 1975.
178. ROY, A.B. A new species of *Azotobacter* producing heavy slime and acid. *Nature*, 182, 120-121, 1958.
179. RUINEN, J. Occurrence of *Beijerinckia* species in the phyllosphere. *Nature*, 177, 220-221, 1956.
180. RUSCHELL, A.P.; VICTORIA, A.L.; SALATI, E. and HENIS, Y. Nitrogen fixation in sugar-cane (*Saccharum officinarum* L.) In: Granhall Ed. Environmental Role of Nitrogen - Fixing Blue-Green Algae and Asymbiotic Bacteria. *Ecol. Bull. (Stockholm)*, 26: 297-303, 1978.
181. SAAMIS, D.L.; GELKONOVA, N.S. and SARCENOVA, L.N. Effect of various sources of phosphorous on the yield and the nitrogen and phosphorous content of fodder yeasts. *Tr. Inst. Microbiol. Virusol. Akad Nauk. Kaz. SSR.*, 11:18-24, 1968.

182. SADIR, R. Estudo de um fermentador para produzir proteínas dos derivados do petróleo. Tese de Livre Docência - FEA/UNICAMP, Campinas, São Paulo, 53 p. 1969.
183. SALES, A.M. e MENEZES, T.J.B. de. Produção de Biomassa proteica de mandioca. Col. Inst. Tec. Alim., 7: 139-146, 1976.
184. SALES, A.M.; MENEZES, T.J.B. e ARAKAKI, T. Produção de Biomassa proteica em melaço de cana-de-açúcar. Col. Inst. Tecn. Alim., 7: 97-105, 1978.
185. SALES, A.M.; MENEZES, T.J.B. de; OKADA, M.; ARAKAKI, T. e LAMO, P.R. de. Produção e avaliação nutricional de biomassa proteica de levedura em melaço. Col. Inst. Tec. Alim. 8: 443-455, 1977.
186. SANTANA, M.H.A. Estudo de aeração e agitação na fermentação com o *Bacillus Thuringiensis*. M. Sc. Thesis, F.E.A. - UNICAMP, Campinas, Jun. 1978.
187. SCHUARTZBERG, H.G. and TREYBAL, R.E. Fluid and particle motion in turbulent stirred tanks. Industrial and engineering chemistry fundamentals, 7: 1, 1968.
188. SCRIMSHAW, N.S.; BRESSANI, R.; WILSON, D. and BÉHAR, M. All vegetable protein mixtures for human feeding. X-Effect of torula yeast on protein quality in INCAP Mixture 9. Amer. J. Clin. Nutr. 11: 537-542, 1962.

189. SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE TREINAMENTO DE VINHOTO (INT. STI - MIC - FUNAT - CTP). 1:1-2,4, Rio de Janeiro, agosto, 1976.
190. SEMINÁRIO INTERNACIONAL SOBRE TRATAMENTO DE VINHOTO (INST.-STI - MIC - FUNAT - CTP); SANTANA, A.G.; MONTEIRO, H. Composição dos resíduos de usinas de açúcar e destilarias de álcool durante a safra canavieira. Brasil Açucareiro, Rio de Janeiro, 80 (5): 38-44, nov. 1972.
191. SENIOR, P.J.; BEECH, G.A.; RITCHIE, G.A.F. and DAWES, E.A. The role of oxygen limitation in the formation of poly-B-hydroxy-butyrate during batch and continuous culture of *Azotobacter beijerinckii*, *Biochem. J.* 128: 1193-1201, 1972.
192. SERZEDELLO, A. Vinhaça como substrato para produção de proteína alimentar. 1^a Ed. Inst. Zimotécnico da ESALQ-USP-Piracicaba, 384-393, 1962.
193. SERZEDELLO, A. Outras aplicações biológicas do melão. II. Sem. de Ferm. Alcoólica Mimiogr. Ilustr. Ed. p/I. Zim. USP - Piracicaba II: 305-327.
194. SERZEDELLO, A.; MIGUEL, A.P.P.N.; CAMARGO, I.H.R. e BARBIERI, G. Estudos sobre adaptação de levedura alimentar em substratos de vinhaça. *Rev. Ag.* 45 (1): 22-27, 1970.

195. SCHCKLADY, C.A. Microbiological protein as a food and feed ingredient. Food manufacture 44: 36, 1969.
196. SILVA, L.C.F. da; ALONSO, S.O.; ZAMBELLO, Jr. E.; ORLANDO, F.J. Efeitos da complementação mineral da vinhaça na fertilização de cana-de-açúcar. Saccharum STAB, São Paulo, 3(11): 40-42, Dez. 1980.
197. SOLOMON, B.O.; ERICKSON, L.E. and YANG, S.S. Utilization of Statistics and Experimental design in data collection and analysis. Biotechnol. and Bioeng. XXV: 2683-2705, 1983.
198. SOLOMON, B.O.; ONER, M.D.; ERICKSON, L.E. and YANG, S.S. Estimation of parameters where dependent observations are related by equality constraints. Annual meeting AICHE, Los Angeles, C.A., 1982, unpublished.
199. SOMOGYI, A. A new reagent for determination of sugars. J. Biol. Chem. 160-161, 1945.
200. SOUW, P.; REIFF, I. and REHM, H.J. Oxidation of n-Alkanes by citric acid producing *Candida* sp. I. Oxidation and assimilation of N. Tetradecane. Eur. J. Appl. Microbiol., 3: 43, 1976.
201. SOUZA, L.G. de, e LIMA, V.A. Produção de levedura alimentar a partir de *Candida tropicalis*. Brasil Açucareiro 5: 23-35, maio, 1974.

202. STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF WATER AND WASTE.
14th Edition. 1975.
203. STANISKIS, J. and LEVISAUKAS, D. Optimization of batch fermentation process by graphycal methods. *Biotechnol. and Bioeng.*, XXV: 985-990, 1983.
204. STARKEY, R.L. and DE P.K. A new species of *Azotobacter*. *Soil Sci.*, 47: 329-343, with 2 plates, 1939.
205. SUIJDAN, Van J.C. Mycelial pellet suspensions, Biotechnological aspects. Ph.D. Thesis, delft University of Technology - 1980.
206. SUIJDAM, Van J.C.; HOLS, H. and KOSSEN, N.W.F. Unstructured model for growth of mycelial pellets in submerged cultures. *Biotechnology and bioengineering*, 14: 177-191, 1982.
207. SUIJDAM, Van J.C.; KOSSEN, N.W.F. and PAUL, P.G. An inoculum technique for the production of fungal pellets. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 10:211-221, 1980.
208. SUMMER, J.B. and SOMERS, G.F. Laboratory Experiments in Biological Chemistry. Academic, 1944.
209. SUNDSTROM, D.W. and KLEI, H.E. Waste water treatment (Prentice - Hall. Engle - Wood Cliffs, N.J.), 1979.

210. SURUCU, G.A.; ENGELBRECHT, R.S. and CHIAN, E.S.K. Thermophilic microbiological treatment of high strength easte-waters nith simultaneous recovey of single-cell protein. *Biotechnol. Bioeng.* 17: 1639, 1975.
211. SUTO, T. Some properties of an ácid tolerant *Azotobacter*, *Azotobacter indicum*. *Tohokv J. Agr. Research.* 7: 369-382, 1957.
212. TAUK, S.M. Estudo preliminar da vinhaça como substrato pa-
ra leveduras. *Rev. Microbiol.* 7 (4): 92-97, 1976.
213. TAUK, S.M. Efeito do tratamento com ácidos minerais em vi-
nhaça, no desenvolvimento de *Candida utilis*. *Ciência e
Cultura*, 30 (3): 350-353, março 1978.
214. TAUK, S.M. Adaptação de leveduras e vinhaça suplementada
com melaço. *Ciência e Cultura*, 31(5):522-530, maio 1979.
215. TAUK, S.M. Culture of *Candida* in vinasse and molasses: Ef-
fect of acid and salt addition on biomass and raw pro-
tein production. *Eur. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 16:
223-227, 1982.
216. TAUK, S.M. e GAMBALE, V. Efeito da adição de H_3PO_4 em cul-
tura mista de levedura em vinhaça. *Brasil Açucareiro*, 5:
9-14, maio 1978.
217. TCHAN, Y.T. Studies of N. Fixing bacteria III. *Azotobacter
Beijerinckii* (Lipman, 1903). var. ácido-tolerans (Tchan,
1952). *Proc. Linnean Soc. N. S. wales.* 78: 83-84, 1953.

218. THATCHER, F.S. Foods and feeds from fungi. Annual review of microbiology, 8: 449, 1954.
219. TODA, K.; YABE, I. and YAMAGATA, T. Kinetics of yeast growth and enzyme synthesis in a phosphate-limited continuous culture. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 16: 10-16, 1982.
220. TOUZI, A.; PREBOIS, J.P.; MOULIN, G.; DESCHAMPS, F. and GALZY, P. Production of food yeast from starchy substrates. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol, 15: 232-236, 1982.
221. TSCHAPEK, M. and GIAMBIAGI, N. Nitrogen fixation of *Azotobacter* in soil - its inhibition by oxygen. Arch. Mikrobiol. 21: 376, 1955.
222. TUSÉ, D. Single-cell protein: current status and future prospects. CRC critical reviews in food science and nutrition. 19, (4), 273-325, 1984.
223. TUSÉ, D.; RUSSEL, L.A. and HSIEH, D.P.H. Nutricional and toxicological evaluation of SCP produced from an environmental waste. Advances in Biotechnology vol II, (Moo-Young, M. and Robinson, C.W. eds). Pergamon Press. Toronto, 363, 1981.
224. VALACICIUS, J. and OLEKIENE, A. Macro and trace elements and fodder yeasd metabolism. The effect of K on yeast enzymic activity and on the assimilation of monosaccharides. Liet. TSR, Mokos Akad. Dark. Ser, C., 2: 59-63, 1967.

225. VASCONCELOS, J.N. e OLIVEIRA, C.G. Composição química dos diferentes tipos de vinhaça das destilarias de álcool de Alagoas - SAFRA 1978/79. *Saccharum* - ano IV, 14, maio, 1981.
226. WANG, D.I.C.; and GBEWONYO, K. Confining mycelial growth to porous microbeads: A novel technique to alter the morphology of non-newtonian mycelial cultures. 15: 967-983, 1983.
227. WASLIEN, C.I.; CALLOWAY, D.H.; MARGEN, S. and COSTA, F. Uric acid levels in men fed algae and yeast as protein sources. *J. Food Sci*, 35: 294, 1970.
228. WEATHERHOLTZ, W.M. and HOLSING, G.C. Acceptance of torula yeast for use as a food supplement, *Ecol. Food Nutr*, 5: 153, 1976.
229. WHITAKER, A.M. and ELSDEN, S.R. The relations between growth and oxygen consumption in microorganism. *J. Gen. Microbiol.* 31: xxii, 1963.
230. WILSON, P.W.; HULL, J.F. and BURRIS, R.H. Competition between free and combined nitrogen in nutrition of *Azotobacter*. *Proc. Nat. Acad. Sci., Wash.* 29: 289, 1943.
231. WORKSHOP ON SINGLE-CELL PROTEIN - SUMMARY REPORT. JA KARTA, INDONÉSIA, February 1-5, 1983 National Academy Press, Washington, D.C., 1-68. 1983.

232. YANEZ, E.; WULF, H.; BALLESTER, D.; FERNANDES, N.; GATTAS, V. and MOONCKENBERG, F. Nutritive value and baking properties of bread supplemented with *Candida utilis*. J. Sci. Food Agrig. 24: 519, 1973.