

**ALGUNS FATORES QUE AFETAM A QUALIDADE DO CONCENTRADO
PROTEICO OBTIDO EM DESTILARIA DE ÁLCOOL**

JOCELEM MASTRODI SALGADO

Auxiliar de Ensino do Departamento de
Tecnologia Rural da ESALQ

Orientador: Dr. José Renato Sarruge

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Fitopatologia.

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
Abril 1976

A minha

MÃE

e aos meus

FILHOS

Thiago

e

Fernanda

D E D I C O

A G R A D E C I M E N T O S

A autora expressa seus agradecimentos:

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo ; à Usina Bom Jesus e aos Departamentos de Tecnologia Rural e Fitopatologia , da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" , pelos recursos que ofereceram em diferentes oportunidades , sem os quais não seria possível o desenvolvimento do presente trabalho.

Ao Professor Dr. José Renato Sarruge , pela valiosa colaboração como orientador e pela revisão dos originais.

Ao Professor Dr. Urgel de Almeida Lima , pelo estímulo constante e valiosas sugestões.

Aos Professores Dr. Ferdinando Galli , Dr. Antonio Joaquim de Oliveira e Dr. José Paulo Stupiello , pelas sugestões e revisão dos originais.

Ao Dr. Décio Barbin , pela orientação nos trabalhos de análise estatística.

A Dr.^a Elke J. B. N. Cardoso , pela versão para o inglês do resumo.

Aos Funcionários Sr. José Fernandes Vieira , Sr. Deovaldo Antonio Pachane e a Estudante Valéria Rufini , pelos valiosos auxílios prestados.

E a todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

Í N D I C E

	Página
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3 - MATERIAL E MÉTODOS	9
3.1 - Processo de Fabricação	9
3.2 - Obtenção de Amostras	12
3.2.1 - Teste de viabilidade	12
3.2.2 - Efeito da lavagem do leite sobre o número de células	12
3.3 - Levantamento das Condições de Produção do Concentrado Proteico da Destilaria	13
3.4 - Ensaio de Fermentação	15
3.4.1 - Meio sintético básico utilizado	15
3.4.2 - Levedura empregada	15
3.4.3 - Meios de desenvolvimento	16
3.4.4 - Inoculação e desenvolvimento	16
3.4.5 - Amostragem e análise	17
3.5 - Efeito de Lavagem nas Amostras em Diferentes Fases do Processamento	17
3.5.1 - Coleta de material na destilaria	17
3.5.2 - Lavagem das amostras de leite de levedura e concentrado proteico	18

	Página
3.6 - Análise Estatística	18
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1 - Teste de Viabilidade	19
4.2 - Efeito da Lavagem do Leite sobre o Número de Células	19
4.3 - Levantamento das Condições de Produção do Concentrado Proteico da Destilaria	20
4.4 - Ensaio de Fermentação	21
4.5 - Efeito de Lavagens nas Amostras em Diferentes Fases do Processamento	25
4.5.1 - Matéria seca	25
4.5.2 - Proteína	28
4.5.3 - Cinzas	35
5 - RESUMO E CONCLUSÕES	43
6 - SUMMARY	45
7 - LITERATURA CITADA	47

1 - INTRODUÇÃO

A produção de proteínas para o consumo animal e humano está em franco desenvolvimento, atendendo uma necessidade que deverá ser ainda maior no decorrer da década de 80 . Espera-se que a demanda mundial de proteína dobre até o fim do século.

Atualmente, as fontes mais importantes de proteínas no mercado mundial são as farinhas de soja e de peixe. A longo prazo parecem ser bastante promissoras as proteínas produzidas a partir de processos fermentativos ("single cell protein" - SCP).

O Brasil embora seja um país em desenvolvimento apresenta um acentuado déficit de proteínas. Segundo a "Food and Agriculture Organization (FAO)" existem na população brasileira cerca de 23 milhões de subnutridos, dos quais 13 milhões no nordeste. Essa estatística considera subnutridos, os indivíduos que recebem menos de 70 gramas de proteínas por dia e sobretudo menos que 35 gramas de proteína animal.

Há necessidade portanto, de ser introduzida uma fonte proteica rica em aminoácidos essenciais, de baixo preço e paladar que satisfaça os hábitos alimentares atuais.

O Brasil é um dos maiores produtores de álcool por via fermentativa e por isso, detentor de um potencial de proteína de levedura, que seria talvez a fonte mais econômica de produção.

Diversas destilarias de álcool, anexas às usinas de açúcar, vêm há alguns anos, produzindo um concentrado proteico constituído de células de *Saccharomyces sp.*, usadas na fermentação alcoólica. Este recebe nomes variados, entre os quais: levedura seca, levedura comercial, etc. No presente trabalho será utilizado o termo concentrado proteico para se referir ao produto final para consumo. Esse concentrado é obtido pela separação de determinada porcentagem de células que normalmente seria retornada à fermentação pelo processo de recuperação, e por sua posterior secagem em secadores de tambor a pressão ambiente.

O teor proteico desse material, ao contrário do que se poderia supor, não é o mesmo das células, ou seja, superior a 45%. O produto comercial é posto a venda com 30 a 35% de proteína bruta, com evidentes perdas econômicas. É necessário estabilizar e melhorar o teor proteico para maior rendimento.

Embora *Saccharomyces sp.* seja considerado como muito exigente em carbono, frágeis e de menor palatabilidade, justifica-se plenamente o seu estudo em função do potencial oferecido pela indústria alcooleira e porque o seu aproveitamento industrial já é fato consumado no país.

O presente trabalho visou estudar a produção de proteína de leveduras nas condições atuais da indústria.

Procurou-se também determinar os fatores que possam elevar o teor de proteína bruta, no material industrial, o qual apresenta ao redor de 30 a 35% , quando teoricamente deveria apresentar índices ao redor de 45% .

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As leveduras alimentares são leveduras secas, fragmentadas, mortas, tendo perdido o poder fermentativo. Normalmente são produzidas de *Saccharomyces* e de *Candida*. As leveduras alimentares de *Saccharomyces* são produzidas em condições de fermentação alcoólica industrial e geralmente, são leveduras de recuperação. Seu teor proteico é de aproximadamente 45% contendo alto teor vitamínico, cujo aproveitamento parece ser mínimo em face às condições atuais de produção em temperatura elevada. (DESMONTS, 1966).

Sua utilização é feita em forma de palhetas, pó, comprimidos, sob a forma de preparações alimentares, extratos ou hidrolisados. O aproveitamento de leveduras não termolisada é desaconselhável, uma vez que é um organismo dotado de uma atividade fermentativa muito grande (BIROLAUD, 1969).

Há, atualmente, interesse por parte das indústrias alimentares para aproveitamento de levedura, entretanto este aproveitamento es tá muito abaixo da realidade. (OESMONTS, 1966).

A variação de fatores físicos e químicos nos meios de fermentação altera a composição vitamínica, a atividade enzimática das leve duras e provavelmente o teor protéico. (DESMONTS, 1966).

A presença de sais de amônio no meio determina uma acelera ção contínua na velocidade de fermentação enquanto que a presença de íons NO_3^- é desfavorável às células de levedura. (BOUROET, 1949).

MARQUES (1966), estudando a influência da forma e quantidade de nitrogênio no rendimento proteico das leveduras, verificou que o meio suplementado com sais de amônio deu um teor maior de proteína quando comparado com o meio suplementado com nitrato.

ABISOU *et alli* (1968) estudaram o mecanismo da autólise das leveduras, tendo por objetivo a utilização de seu poder enzimático para proteólise de outras substâncias, como por exemplo torta de soja.

O sistema de secagem, de acordo com ADRIAN e FRAGNE (1970), tem importância considerável no valor alimentar do produto acabado, devendo ser intenso para romper as paredes das células, mas sem prejudicar as qualidades nutritivas. Utilizaram temperaturas entre 43 a 80 °C como pré aquecimento para provocar a plasmólise, e em seguida fizeram a secagem por atomização ou em secadores de tambores.

LE FRANÇOIS (1961) chama atenção para o fato de que os rendimentos clássicos sobre substrato celulósico são de 40 a 45%. A variação é devida à natureza dos açúcares presentes e ao teor de ácidos

orgânicos do substrato, os quais influem no aumento de produção de levedura. A qualidade das leveduras, a regularidade de aparência e sabor dependem do processo de fabricação e principalmente das lavagens e acondicionamento. Em outro trabalho, o mesmo autor insiste na importância da centrifugação e lavagens, que permitem elevar o teor de matéria seca dos leites de leveduras acima de 16% , mesmo quando o substrato é de resíduos sulfúricos.

Segundo DESMONTS (1966), a levedura sadia não fixa facilmente na sua superfície as impurezas insolúveis do mosto , o que ocorre quando a mesma é enfraquecida por altas temperaturas de fermentação ou pela prática da pós-fermentação.

Para eliminar as impurezas da suspensão de células (vinho), o mesmo autor sugere uma ou duas lavagens com água, seguida de centrifugação.

As leveduras comportam-se de maneira diferente, dependendo do meio em que se desenvolvem. Foi observado que *Saccharomyces cerevisiae* e *Torula utilis* crescendo em meio de licor de milho e em presença de 1 a 5 mg por ml de ácido cetoadípico formaram L-lisina com uma eficiência de 50 a 75% . Resultados semelhantes foram obtidos com valores mais altos de D-L-ácido α -aminoadípico. (BROQUISTI *et alli* 1961).

Em outro tipo de fermentação para produção de leveduras, a eficiência de conversão de ácido 2-oxiadípico para lisina foi da ordem de 63% , utilizando melaço como única fonte de carbono. (JENSEN e SHU, 1961) .

Por outro lado, a produção de valina em leveduras é influenciada pela presença, no meio, de ácido acético, glucose mais ácido acético, ácido acético mais formiato de sódio, utilizando a glucose como principal fonte de carbono. (MCMANUS, 1954).

O comportamento de *Saccharomyces carlsbergensis* para ácido pantotênico, em meio de ATKINS, é bastante alterado pela adição de pequena quantidade de hidrolisado de caseína (0,032 a 0,32 mg/ml) no meio ensaiado. (WALLER, 1970).

VOSTI e JOSLYN (1954) verificaram que o pH tem importância na autólise de levedura, sendo menos susceptíveis aquelas que crescem a pH = 3,83. Os mesmos autores verificaram que a autólise foi estimulada em condições de baixa temperatura (ao redor de 33 °C) e presença de solução 0,01 M de DNA, bem como por pré tratamento das células a 60 °C com solução de TIDE a 2%. Entretanto, soluções mais diluídas de DNA, solução 0,01 M de azida de sódio, fluoreto de sódio, ou cianeto de potássio não ativaram a autólise a essa temperatura.

Diante da hipótese sugerida por TANNEBAUM e MILLER (1967), de que a presença de uma parede celular em levedura e em bactéria poderia limitar o valor nutricional da proteína, foram investigados vários métodos de desintegração da parede celular, destacando-se a desintegração química, enzimática e mecânica. (EDEBO, 1960; HOFSTEN e TJEDER, 1961; HUGHES, 1961; REHACEK, 1969).

Em 1970 foi proposto um novo método para obtenção de concentrado proteico de microrganismos, através do qual uma alta produção de proteína de levedura e alga (30 a 40%) foi conseguida. (HEDENSKOG *et alii* 1970).

O elevado teor de ácido nucleico de leveduras poderá se constituir em um obstáculo à utilização de proteína de microrganismos, em razão de conduzir a uma precipitação de ureatos nos tecidos e juntas, causando problemas de articulação e formação de cálculos renais (FALANGHE, 1975). O problema pode ser contornado por métodos que reduzem a concentração do ácido nucleico. CANEPA *et alii* (1972) descrevem um método que permite uma grande redução de ácido nucleico em *Saccharomyces cerevisiae* baseado no choque de calor sobre a levedura em solução de fosfato (50 μ M) seguido de diálise. Nessas condições, a relação mg de proteína / mg de ácido nucleico atinge valor de 50 a 60 que é cerca de dez vezes maior do que a mesma relação sem o tratamento.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho proposto foi realizado na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo. As amostras de leite de leveduras e do concentrado proteico utilizadas foram obtidas na destilaria da Usina Bom Jesus, situada no município de Rio das Pedras, SP. a qual possui instalação de recuperação e secagem de levedura para produção de proteína.

3.1 - PROCESSO DE FABRICAÇÃO

O processamento industrial desenvolve-se como esquematizado na Figura 1 e da seguinte forma: após a fermentação, o vinho é enviado a um decantador e em seguida a uma centrífuga. Separa-se aí o vinho de levurado que vai para a destilação e o leite de levedura com 15^o Brix

do qual, cerca de 90% são destinados a um novo ciclo de fermentação e 10% para a produção do concentrado proteico. Este último é lavado na proporção de 3.000 litros de leite para 4.000 litros de água. Após nova centrifugação o leite com 13 a 18^o Brix passa para dois tanques alimentadores do secador, onde sofre aquecimento por injeção de vapor até 90^oC. Depois desse tratamento, segue para o secador de tambor o qual é aquecido com vapor sob pressão de 1,5 a 2,8 kg/cm² (110 a 128^oC) sendo obtida uma película de concentrado proteico com 5 a 6% de umidade e um teor de proteína bruta que varia de 18 a 32% .

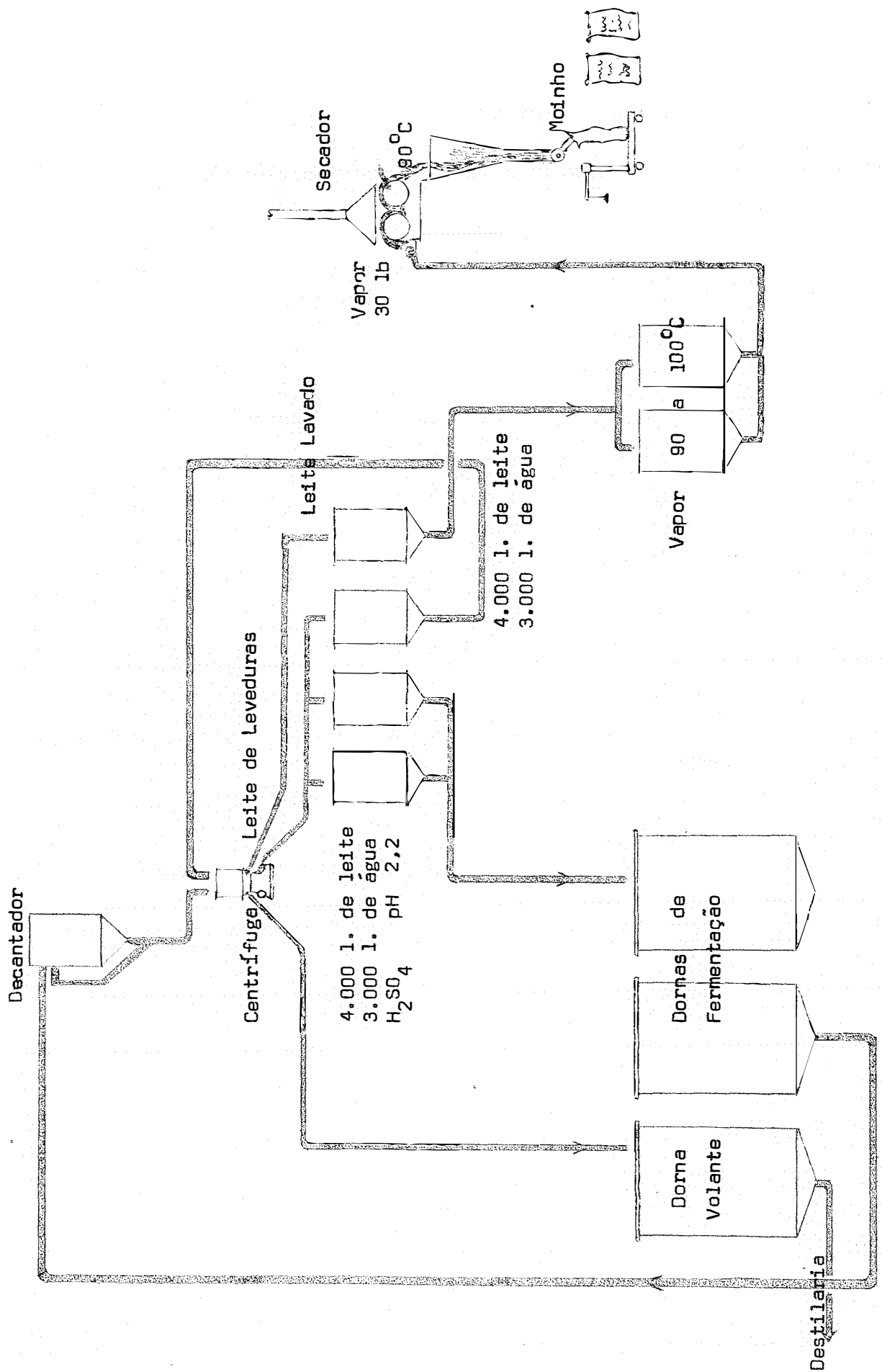


FIGURA 1 - CONCENTRADO PROTEICO DE LEVEDURAS DE DESTILARIA - *Saccharomyces sp.*

3.2 - OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

O concentrado proteico foi obtido na destilaria da Usina Bom Jesus, situada no município de Rio das Pedras, SP. Foram obtidas também, amostras de leite de leveduras produzidos após turbinagem e em diferentes etapas do processamento, os quais foram submetidos a diversos tratamentos em laboratório.

3.2.1 - Teste de Viabilidade

Para verificar a viabilidade das células durante e após o tratamento térmico na destilaria, amostras de 1 ml do leite 1 (sem ser termolisado), do leite 2 (aquecido à 90-100 °C) e de concentrado proteico na diluição de 1:10, foram semeadas em placas contendo meio de malte. Após 24 horas de incubação a 28 °C foi feita a leitura do número de colônias desenvolvidas.

3.2.2 - Efeito da Lavagem do Leite sobre o Número de Células de Levedura

Foram utilizados três tratamentos com emprego do leite 1: não lavado, lavado uma vez e submetido a duas lavagens.

O método utilizado foi o de diluição em série, seguido da contagem do número de células no hemacitômetro. A diluição mais adequada foi 1×10^{-3} células/ml.

3.3 - LEVANTAMENTO DAS CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO DO CONCENTRADO PROTEICO DA DESTILARIA

Foram coletadas amostras preliminares a fim de verificar as condições de produção da destilaria, e a variabilidade em função do dia e período, bem como da intensidade de secagem. As amostras foram retiradas em dois pontos do cilindro secador, A e B respectivamente, durante seis dias nos períodos da manhã e da tarde, conforme mostra a Tabela 1.

O ponto A situado entre 20 e 35° da vertical foi fixado para se obter um produto conservável com mais umidade do que o retirado no ponto B, onde existe um raspador que retira a película seca de levedura. Os pontos A e B no cilindro secador do concentrado proteico estão esquematizado na Figura 2.

Para se obterem dados mais representativos, foram coletadas amostras compostas, de cinco em cinco minutos durante uma hora, recolhidas em dois recipientes de plástico, e ao final do período o conteúdo foi bem homogeneizado. Foi retirada uma alíquota de um quilo de cada recipiente e colocada em saco plástico hermeticamente fechado, para posterior análise em laboratório.

Eliminação de Vapor
de Água da Secagem

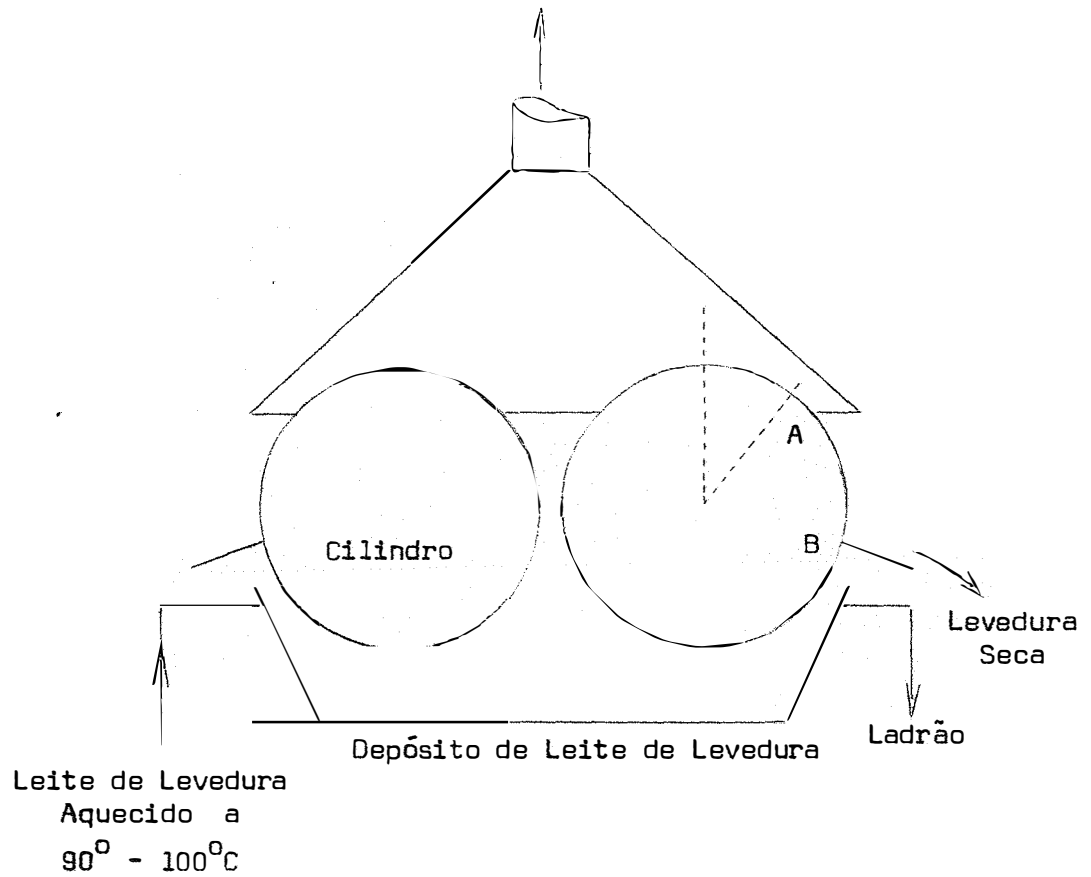


FIGURA 2 - Esquema dos pontos A e B no cilindro secador
do concentrado proteico

3.4 - ENSAIO DE FERMENTAÇÃO

No laboratório, foram conduzidos ensaios de fermentação para verificar a possível influência da natureza dos compostos nitrogenados e da variação da relação C/N na porcentagem de proteína bruta. Para tanto, foi utilizado meio básico sintético fornecendo diferentes quantidades de nitrogênio na forma nítrica e amoniacal, bem como de glucose para as leveduras.

3.4.1 - Meio Sintético Básico Utilizado

Diversos meios foram testados para verificar a viabilidade de um bom desenvolvimento do microrganismo. O meio escolhido foi o apresentado no manual da DIFCO (1953) cuja composição é:

Glucose	10 g
KH_2PO_4	1 g
$MgSO_4$	0,5 g
NaCl	0,1 g
$CaCl_2$	0,1 g
Extrato de levedura	2 g
Água	completar a um litro.

3.4.2 - Levedura Empregada

A levedura utilizada foi a IZ 1831, desenvolvida em meio de malte inclinado por 72 horas.

O inóculo foi preparado transferindo-se, através de uma alça de platina, células desenvolvidas para um erlenmeyer de 500 ml con-

tendo 200 ml do meio completo, devidamente esterilizado (quantidade de células $\approx 10^7$ células/ml). As células foram incubadas durante 24 horas, sob agitação de 90 rpm e temperatura de 26 a 30 °C.

3.4.3 - Meios de Desenvolvimento

Foram preparados 30 frascos erlenmeyer de 500 ml, cada qual contendo 200 ml do meio básico descrito em 3.4.1.

O total de frascos foi subdividido em seis tratamentos, contendo cada qual 5 erlenmeyer, dos quais quatro eram utilizados como repetições na condição do experimento e um deles aproveitado para preparação do inóculo, conforme descrito em 3.4.2. Os tratamentos foram os seguintes:

meio básico + NaNO_3 1% + glucose 1%

meio básico + NaNO_3 1% + glucose 5%

meio básico + NaNO_3 1% + glucose 10%

meio básico + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1% + glucose 1%

meio básico + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1% + glucose 5%

meio básico + $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1% + glucose 10%

Após a adição de cada componente, os frascos foram tamponados com algodão e esterilizados por quinze minutos a 121 °C.

3.4.4 - Inoculação e Desenvolvimento

Do inóculo, transferiu-se asepticamente 40 ml do conteúdo perfeitamente homogeneizado por agitação, para os frascos com 200 ml de meio dos diferentes tratamentos.

Os frascos foram mantidos em agitação a 90 rpm em temperatura de 26 a 30 °C por 72 horas, quando considerava-se o processo terminado.

3.4.5 - Amostragem e Análise

As células obtidas nos ensaios foram separadas por centrifugação a 5.000 rpm em centrífuga refrigerada a 0 °C . Após três lavagens com água destilada, as células foram levadas a estufa a 65 °C por uma noite.

Desse material foram retiradas três amostras de cada tratamento nos quais foram feita a determinação do nitrogênio total pelo método de micro-Kjeldahl. (BAILEY, 1967).

A proteína bruta foi obtida por multiplicação pelo fator 6,25 .

3.5 - EFEITO DE LAVAGEM NAS AMOSTRAS EM DIFERENTES FASES DO PROCESSAMENTO

3.5.1 - Coleta de Material na Destilaria

Foram retiradas na destilaria amostras do concentrado proteico (levedura seca) de quinze em quinze minutos durante uma hora, recolhidas em recipiente de plástico, homogeneizadas e levadas ao laboratório.

Simultaneamente retirou-se também amostras dos leites que de ram origem a esse concentrado proteico. Desses leites, o não aquecido convencionalmente se denominará leite 1 e o termolisado a 90-100 °C leite 2 .

Nessas amostras, foram feitas com quatro repetições, determinações de cinzas, matéria seca e proteína.

3.5.2 - Lavagens das Amostras de Leite de Levedura e Concentrado Proteico

O leite 1 e 2 que deram origem ao respectivo concentrado proteico foram lavados com água e com solução de K_2CO_3 1% , a fim de eliminar possíveis impurezas.

A lavagem procedeu-se como descrito abaixo:

100 g do leite foram adicionados a 100 ml de água ou solução de K_2CO_3 1% , sendo a mistura centrifugada a 2.000 rpm por quinze minutos em centrífuga refrigerada. O sobrenadante foi retirado e adicionou-se sobre o resíduo mais 100 ml de água ou solução de K_2CO_3 1% , repetindo-se a centrifugação. Esse procedimento foi repetido por quatro vezes. Após a última lavagem, o resíduo foi transferido para placas de petri e seco em estufa a vácuo controlada a $60^{\circ}C$, até peso constante. Desse material foram retiradas alíquotas para determinações de cinzas e proteínas.

Nas leveduras secas procedeu-se a determinação de matéria seca e nesta última analisaram-se cinzas e proteínas.

3.6 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados estatisticamente segundo PIMENTEL GOMES (1970).

4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - TESTE DE VIABILIDADE

Após incubação a 28 °C por 24 horas as placas com amostras de leite de levedura não aquecido na destilaria apresentaram-se recobertas de colônias contrastando com as placas de leite aquecido a 90-100 °C . Estas apresentaram um número reduzido de colônias nas mesmas condições de diluição (1:10) , atestando uma termólise incompleta , apenas razoável.

4.2 - EFEITO DA LAVAGEM DO LEITE SOBRE O NÚMERO DE CÉLULAS

A lavagem dos leites de levedura não prejudicou o número de células que foi de $3,73 \times 10^9$ células/ml de leite recém turbinado e

$3,10 \times 10^9$ células/ml de leite submetido a uma lavagem.

A contagem em um leite lavado duas vezes ascendeu a $5,28 \times 10^9$ células/ml, provavelmente devido a eliminação das impurezas.

O concentrado proteico obtido na destilaria mostrou um grande número de colônias nas placas quando teoricamente não deveria haver crescimento, pois o aquecimento $90-100^{\circ}\text{C}$ e a secagem industrial deveriam ter destruído todas as células.

4.3 - LEVANTAMENTO DAS CONDIÇÕES DE PRODUÇÃO DO CONCENTRADO PROTEICO DA DESTILARIA

Os resultados das análises dos teores de proteína nas amostras retiradas na destilaria e o respectivo resumo da análise estatística, aparecem nas Tabelas 1 e 2.

TABELA 1 - Teor de proteína em porcentagem (média de quatro repetições) no concentrado proteico retirado em diferentes dias e períodos.

Dias	Período da Manhã		Período da Tarde	
	Ponto A	Ponto B	Ponto A	Ponto B
1º	33,49	35,43	38,76	32,00
3º	31,63	32,88	31,49	32,99
4º	34,00	31,58	31,46	30,70
9º	34,68	34,03	33,95	34,18
10º	33,60	32,57	31,04	33,25
11º	32,16	31,72	31,41	31,98

TABELA 2 - Análise estatística do teor proteico (%) no concentrado proteico retirado nos diferentes dias e períodos

Dados transformados em $\text{arc sen } \sqrt{X}$

Causa de Variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Dia	5	12,2592	2,4518	1,48 n.s.
Período	1	0,3456	0,3456	0,210 n.s.
Ponto	1	0,2817	0,2817	0,170 n.s.
Dia x Período	5	1,4495	0,2899	0,175 n.s.
Dia x Ponto	5	3,4729	0,6946	0,420 n.s.
Período x Ponto	1	0,0337	0,0337	0,020 n.s.
Resíduo	5	8,2684	1,6537	
Total	23			

C. V. \approx 4,72%

O coeficiente de variação foi relativamente baixo, indicando uma boa precisão dos dados para interpretação dos resultados.

Não houve valor significativo, mostrando que a produção da destilaria foi homogênea dentro das condições em que o material foi colhido.

4.4 - ENSAIO DE FERMENTAÇÃO

Os resultados dos teores proteicos das leveduras nas fermentações conduzidas em laboratório, com variação da fonte de nitrogênio (forma nítrica e amoniacal) e do teor de glucose (relação C/N) aparecem na Tabela 3. O resumo da análise estatística dos resultados se en-

contram na Tabela 4 .

TABELA 3 - Teor de proteína de levedura (%) em função da fonte de Nitrogênio e do teor de glucose

Tratamentos		Repetições			
Forma de N	Glucose (%)	1	2	3	4
NO ₃	1	41,20	40,50	43,10	41,50
NH ₄	1	47,35	47,30	49,10	49,05
NO ₃	5	25,40	25,30	29,15	30,35
NH ₄	5	45,15	43,20	45,40	43,05
NO ₃	10	28,00	28,40	29,30	28,40
NH ₄	10	45,05	48,40	47,30	48,50

TABELA 4 - Análise estatística do teor de proteína de levedura (%) em função da fonte de Nitrogênio e do teor de glucose

Dados: Transformados em $\text{arc sen } \sqrt{X}$

Causa de Variação	G. L.	S. Q.	Q. M	F
Fonte N (F)	1	416,750	416,7500	504,72 **
Glucose (G)	2	128,7103	64,3552	77,94 **
F x G	2	62,8454	31,4227	38,06 **
Resíduo	18	14,8629	0,8257	
Total	23			

C. V. = 2,12%

Desdobramento dos Graus de Liberdade

Causa de Variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Fontes de Nitrogênio dentro de Glucose 1%	1	28,9560	28,9560	35,07 **
Fontes de Nitrogênio dentro de Glucose 5%	1	201,1015	201,1015	243,55 **
Fontes de Nitrogênio dentro de Glucose 10%	1	249,5378	249,5378	302,21 **
Resíduo	18	14,8629	0,8257	

ou

Causa de Variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Glucose dentro de NO ₃	2	179,8849	89,9425	108,93 **
Glucose dentro de NH ₄	2	11,6707	5,8353	7,07 **
Resíduo	18	14,8629	0,8257	

Comparação das médias pelo teste de Tukey

Glucose (%)	Fontes	
	NO ₃	NH ₄
1	40,15	43,95
5	31,63	41,66
10	32,28	43,45

D.M.S. = 1,64

Do exame dos dados e da análise estatística sobre a produção de proteína variando a forma nitrogenada e a relação C/N seguem-se as seguintes apreciações:

O nitrogênio amoniacal no meio sintético elevou a porcentagem de proteína. Talvez isso deva-se ao fato de que o nitrogênio amoniacal já está reduzido a nível de oxi-redução de nitrogênio protéico, enquanto que o nitrogênio da forma nítrica deve sofrer uma redução prévia. Provavelmente esse mecanismo de redução afetou a produção de proteína. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por MARQUES (1966) e BOURDET (1949).

Por outro lado, quando a fonte nitrogenada foi NO_3^- , houve uma diminuição no teor proteico quando a concentração de glucose foi elevada de 1 para 5 ou 10%. No meio nutritivo quando a fonte nitrogenada foi NH_4^+ houve decréscimo no teor proteico apenas para o tratamento com 5% de glucose.

Com o aumento da relação C/N o decréscimo da porcentagem de proteína foi relativamente pequeno para suplementação amoniacal, maior para suplementação sob a forma nítrica, indicando uma dependência entre o teor proteico e a forma de alimentação nitrogenada. Esses resultados estão de acordo com aqueles citados por KRETZCHMAR (1961).

4.5 - EFEITO DE LAVAGENS NAS AMOSTRAS EM DIFERENTES FASES DO PROCESSAMENTO

4.5.1 - Matéria Seca

Os resultados dos ensaios de lavagens com água e solução de K_2CO_3 sobre o teor de matéria seca do concentrado proteico e dos leites que deram origem ao mesmo, encontram-se na Tabela 5 . A análise estatística da porcentagem de matéria seca no resíduo obtido pela lavagem das amostras aparece na Tabela 6 .

TABELA 5 - Fracionamento da matéria seca no resíduo e no sobrenadante, pela lavagem do concentrado proteico e dos leites de leveduras. (Amostras de 100 gramas de material)

	Original		Lavado com Água		Lavado com Solução de K_2CO_3					
	(g)	(%)	Resíduo (g)	Resíduo (%)	Sobrenadante (g)	Sobrenadante (%)	Resíduo (g)	Resíduo (%)	Sobrenadante (g)	Sobrenadante (%)
Concentrado Proteico	96,08	100	55,52	57,78	40,56	42,22	53,29	55,46	42,79	44,53
	93,89	100	51,82	55,20	42,07	44,80	58,00	61,77	35,89	38,12
	95,35	100	53,21	55,80	42,14	44,20	53,01	55,59	42,34	44,41
	95,61	100	51,77	53,59	44,84	46,41	52,41	54,25	44,20	45,75
Leite 1	11,03	100	9,04	81,89	1,99	18,11	8,90	80,69	2,13	19,31
	11,28	100	9,05	80,19	2,23	19,81	8,99	78,85	2,39	21,15
	11,40	100	8,95	78,50	2,45	21,50	9,25	81,16	2,15	18,84
	11,45	100	9,18	80,18	2,27	19,82	8,98	78,41	2,47	21,59
Leite 2	15,13	100	9,28	61,33	5,85	9,67	36,67	63,93	5,46	36,07
	14,72	100	8,73	59,30	5,99	9,03	40,70	61,35	5,69	38,65
	14,33	100	8,93	62,27	5,40	9,02	31,73	62,95	5,31	37,05
	14,53	100	8,65	59,48	5,88	8,91	40,52	61,30	5,62	38,70

TABELA 6 - Análise estatística do fracionamento da matéria seca (%) no resíduo, obtido por lavagem dos leites e do concentrado proteico

Dados convertidos em $\text{arc sen } \sqrt{X}$

Causa de Variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Material	2	984,3954	492,1977	369,40 **
Lavagem	1	1,3920	1,3920	1,04
Material x Lavagem	2	1,9251	0,9625	0,72
Resíduo	18	23,9842	1,3324	
Total	23	1.011,6967		

C. V. = 2,12%

Comparação das médias pelo teste de Tukey

Material	Lavado com água	Lavado com solução de K_2CO_3
Concentrado Proteico	48,19	48,86
Leite 1	63,53	63,25
Leite 2	51,09	52,15

D.M.S. (5%) = 2,08

O leite 1 foi o que apresentou menor concentração de matéria seca (11,29%), enquanto que os maiores teores encontram-se no concentrado proteico (95,48%) .

Pela lavagem do material original com água, verificou-se que perdeu no sobrenadante uma fração menor para o leite 1 (19,81%) , valores intermediários (39,4%) para o leite 2 e valores maiores (44,4%) para o concentrado proteico.

Não foi possível detectar diferenças de comportamento para a lavagem com água e com carbonato de potássio.

Isto mostra que a lavagem com água ou com solução de K_2CO_3 produz resultados semelhantes, não se justificando portanto o emprego de solução de K_2CO_3 devido principalmente ao custo da operação.

4.5.2 - Proteína

Os resultados dos ensaios de lavagens com água e com solução de K_2CO_3 sobre a porcentagem de proteína na matéria seca dos resíduos encontram-se na Tabela 7 . O resumo da análise estatística dos resultados aparecem na Tabela 8 .

TABELA 7 - Teor de proteína (%) na matéria seca original e nos resíduos obtidos por lavagens com água e com solução de K_2CO_3

	Original	Resíduo Lavado com água	Resíduo Lavado com solução de K_2CO_3
	33,16	46,29	41,47
Concentrado	32,90	46,11	41,82
Proteico	33,16	46,72	42,00
	32,64	45,76	42,17
	39,37	44,89	42,17
Leite 1	38,67	44,89	42,35
	38,67	43,05	43,05
	39,11	43,84	42,96
	34,21	41,82	40,86
Leite 2	32,55	42,26	39,72
	34,56	41,74	41,61
	33,16	42,52	40,25

TABELA 8 - Análise estatística da porcentagem de proteína na matéria seca original e nos resíduos obtidos por lavagens com água e solução de K_2CO_3

Dados convertidos em $\text{arc sen } \sqrt{X}$

Causa de Variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Material (M)	2	20,5009	10,2504	67,93 **
Tratamento (T)	2	186,7167	93,3584	618,68 **
Interação M x T	4	27,7459	6,9365	45,97 **
Resíduo	27	4,0733	0,1509	
Total	35	239,0368		

C. V. = 0,99%

Desdobramento dos Graus de Liberdade

Causa de Variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Tratamento dentro de Concentrado Proteico	2	137,4736	68,7368	455,51 **
Tratamento d. Leite 1	2	19,4286	9,7143	64,38 **
Tratamento d. Leite 2	2	57,5604	28,7802	190,72 **
Resíduo	27	4,0733	0,1509	

ou

Causa de Variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Materiais d. Originais	2	34,1455	17,0728	113,14 **
Materiais d. de água	2	11,3288	5,6644	37,54 **
Materiais d. solução de K_2CO_3	2	2,7725	1,3862	9,19 **
Resíduo	27	4,0733	0,1509	

Comparação das médias pelo teste de Tukey

Material	Original	Lavado com água	Lavado com so- lução de K_2CO_3
Concentrado Proteico	34,71	42,80	40,30
Leite 1	38,58	41,61	40,73
Leite 2	35,41	40,42	39,57

D. M. S. (Tukey 5%) = 0,68

Pela análise estatística, observa-se diferença no teor proteico entre os materiais originais, e os resíduos lavado com água e com solução de K_2CO_3 .

O maior aumento da concentração proteica na matéria seca foi devido a lavagem do concentrado com água que ascendeu de 32,96% para 46,22%. A menor eficiência de lavagem em termos de concentração de proteína foi o leite 1. A lavagem com solução de K_2CO_3 apresentou um efeito menor na melhoria da concentração proteica de matéria seca quando comparada com a lavagem com água.

Esses dados estão de acordo com DESMONTS (1966), que obteve os melhores resultados para eliminação de impurezas, com quatro lavagens do leite de levedura com água, embora recomende para fins práticos apenas duas.

Com os dados anteriores foi calculado o fracionamento da proteína do material original pela lavagem com água e solução de K_2CO_3 , a fim de se avaliar as possíveis perdas da mesma durante os processos. Os dados aparecem na Tabela 9. A análise estatística dos resultados encontra-se na Tabela 10.

TABELA 9 - Fracionamento da proteína no resíduo e no sobrenadante, pela lavagem do concentrado proteico dos leites de levedura. (Amostras de 100 gramas de material)

	Original		Lavado com água		Lavado com solução de K_2CO_3					
	(g)	(%)	Resíduo (g)	(%)	Sobrenadante (g)	(%)	Resíduo (g)	(%)	Sobrenadante (g)	(%)
Concentrado Proteico	33,16	100	26,74	80,63	6,42	19,37	23,00	69,35	10,16	30,65
	32,90	100	25,45	77,35	7,45	22,65	25,83	78,51	7,07	21,49
	33,16	100	26,07	78,62	7,09	21,38	23,35	70,42	9,81	29,58
	32,64	100	24,52	75,12	8,12	24,88	22,88	70,09	9,76	29,91
Leite 1	39,37	100	36,76	93,37	2,61	6,63	34,03	86,44	5,34	13,56
	38,67	100	35,99	93,07	2,67	6,93	33,39	89,59	3,88	10,41
	38,67	100	33,79	87,38	4,88	12,62	34,94	90,35	3,73	9,65
	39,11	100	35,15	89,87	3,96	10,13	33,69	86,14	5,42	13,86
Leite 2	34,21	100	25,65	74,98	8,56	25,02	26,12	76,35	8,09	23,65
	32,55	100	25,06	76,99	7,49	23,01	24,37	74,67	8,18	25,13
	34,56	100	25,99	75,20	8,57	24,80	26,22	75,67	8,34	24,13
	33,16	100	25,29	76,27	7,87	23,73	24,67	74,40	8,49	25,60

TABELA 10 - Análise estatística do fracionamento da proteína (%) no resíduo ; obtido por lavagem dos leites e do concentrado proteico

Dados convertidos em $\text{arc sen } \sqrt{X}$

Causa de Variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Material	2	637,0596	336,5298	63,93 **
Lavagem	1	22,7760	22,7760	4,32
Material x Lavagem	2	26,9289	13,4644	2,55
Resíduo	18	94,7487	5,2638	
Total	23	817,5132		

C. V. = 3,60%

Comparação das médias pelo teste de Tukey

Original	Lavado com água	Lavado com solução de K_2CO_3
Concentrado Protéico	62,23	58,14
Leite 1	72,54	69,85
Leite 2	59,28	60,22

D.M.S. (1%) = 4,41

D.M.S. (5%) = 3,41

Pela análise dos resultados da proteína fracionada pela lavagem com água, verifica-se que as menores perdas ocorreram para o leite 1 (9,07%), sendo que as perdas para o leite 2 e concentrado proteico, foram semelhantes.

Essas maiores perdas para o leite 2 e para o concentrado proteico, possivelmente se deve a termólise. Pela termólise, pode ter havido hidrólise das frações proteicas que foram eliminados na forma de compostos nitrogenados solúveis no processo de lavagem com água.

Quando ao tipo de lavagem, com exceção do concentrado proteico, não houve diferenças entre as perdas de proteína pela lavagem com água ou com solução de K_2CO_3 .

4.5.3 - Cinzas

Os resultados dos ensaios de lavagens com água e com solução de K_2CO_3 sobre a porcentagem de cinzas na matéria seca dos resíduos encontram-se na Tabela 11. O resumo da análise estatística dos resultados aparecem na Tabela 12.

TABELA 11 - Teor de cinzas (%) na matéria seca original e nos resíduos obtidos por lavagens com água e solução de K_2CO_3

	Original	Resíduo Lavado com água	Resíduo Lavado com solução de K_2CO_3
	10,90	2,70	11,05
Concentrado	11,90	2,90	11,42
Proteico	11,92	2,92	10,72
	12,42	2,82	11,12
	9,10	5,55	9,30
	7,72	6,02	7,65
Leite 1	8,62	5,45	6,62
	8,85	5,15	8,15
	8,70	2,55	7,87
	9,75	2,60	7,65
Leite 2	11,47	2,62	7,75
	10,67	2,50	7,65

TABELA 12 - Análise estatística da porcentagem de cinzas na matéria seca original e nos resíduos obtidos por lavagem com água e com solução de K_2CO_3

Dados convertidos em arc sen X

Causa de Variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Material (M)	2	20,3402	10,1701	14,53 **
Tratamento (T)	2	421,7279	210,8640	301,19 **
M x T	4	67,8937	16,9734	24,24 **
Resíduo	27	18,9034	0,7001	
Total	35	528,8652		

C. V. = 5,36%

Desdobramento dos Graus de Liberdade

Causa de Variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Tratamento d. Concentrado Proteico	2	270,7948	135,3974	193,40 **
Tratamento d. Leite 1	2	31,8111	15,9056	22,72 **
Tratamento d. Leite 2	2	187,0156	93,5078	133,56 **
Resíduo	27	18,9034	0,7001	

ou

Causa de Variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Material d. Original	2	18,8509	9,4254	13,46 **
Material d. de Água	2	45,8228	22,9114	32,72 **
Material d. de Solu- ção de K_2CO_3	2	23,5602	11,7801	16,83 **
Resíduo	27	18,9034	0,7001	

Comparação das médias pelo teste de Tukey

Material	Original	Lavado com água	Lavado com solu- ção de K_2CO_3
Concentrado Proteico	20,06	9,68	19,41
Leite 1	17,00	13,56	17,03
Leite 2	18,51	9,19	16,08

D.M.S. (Tukey 5%) = 1,46

A análise dos dados mostra que o concentrado proteico apresentou a maior concentração de cinza no material original (11,78%), bem como apresentou maior diferença entre o teor de cinzas no material original (11,78%) e no resíduo lavado com água (2,83%). O leite 1 foi o que apresentou a menor diferença (8,57 para 5,54).

A lavagem com solução de K_2CO_3 apresentou resíduos com teores de cinzas semelhantes ao material original, exceção feita ao leite 2.

Com os dados anteriores foi calculado o fracionamento de cinza do material original pela lavagem com água e com solução de K_2CO_3 , a fim de se avaliar as possíveis perdas da mesma durante os processos. Os dados aparecem na Tabela 13. O resumo da análise estatística encontra-se na Tabela 14.

TABELA 13 - Fracionamento da cinza no resíduo e no sobrenadante, pela lavagem do concentrado proteico e dos leites de levedura. (Amostras de 100 gramas de material)

	Original		Lavado com Água		Lavado com Solução de K_2CO_3	
	(g)	(%)	Resíduo (g)	Resíduo (%)	Sobrenadante (g)	Sobrenadante (%)
Concentrado Proteico	10,90	100	1,56	14,31	9,34	85,69
	11,90	100	1,60	13,44	10,30	86,56
	11,92	100	1,57	13,17	10,35	86,83
	12,42	100	1,51	12,16	11,01	87,84
Leite 1	9,10	100	4,54	49,89	4,56	50,11
	7,72	100	4,83	62,56	2,89	37,44
	8,62	100	4,28	49,65	4,34	50,35
	8,85	100	4,13	46,67	4,72	53,33
Leite 2	8,70	100	1,56	17,93	1,56	82,07
	9,75	100	1,54	15,79	1,54	84,21
	11,47	100	1,63	14,21	1,63	85,79
	10,67	100	1,49	13,96	1,49	86,04
			6,13	56,24	6,13	56,24
			6,44	54,12	6,44	54,12
			5,99	50,25	5,99	50,25
			6,03	48,55	6,03	48,55
			4,77	43,76	4,77	43,76
			5,46	45,88	5,46	45,88
			5,93	49,75	5,93	49,75
			6,39	51,45	6,39	51,45
			7,50	82,42	7,50	82,42
			6,03	78,11	6,03	78,11
			5,37	62,30	5,37	62,30
		6,39	72,20	6,39	72,20	
		1,60	17,58	1,60	17,58	
		1,69	21,89	1,69	21,89	
		3,25	37,70	3,25	37,70	
		2,46	27,87	2,46	27,87	
		5,03	57,82	5,03	57,82	
		4,69	48,10	4,69	48,10	
		4,88	42,54	4,88	42,54	
		4,69	43,95	4,69	43,95	
		3,67	42,18	3,67	42,18	
		5,06	51,90	5,06	51,90	
		6,59	57,46	6,59	57,46	
		5,98	56,05	5,98	56,05	

TABELA 14 - Análise estatística do fracionamento da cinza (%) no resíduo obtido por lavagem dos leites e do concentrado do proteico

Dados convertidos em $\text{arc sen } \sqrt{X}$

Causa de Variação	G. L.	S. Q.	Q. M.	F
Material (M)	2	1.959,8018	979,9008	82,7653 **
Lavagem (L)	1	2.315,3597	2.315,3597	195,5622 **
M x L	2	143,4666	71,7333	6,0588 *
Resíduo	18	213,1123	11,8395	
Total	23	4.631,7403		

C. V. = 8,59

Comparação das médias pelo teste de Tukey

Material	Lavado com água	Lavado com solução de K_2CO_3
Concentrado Proteico	21,32	46,29
Leite 1	46,24	59,40
Leite 2	23,10	43,90

D.M.S. (5%) = 5,02

Pela análise dos resultados da cinza fracionada observa-se que a solubilidade dos minerais em água é menor para o leite 1 ou seja, pela lavagem cerca de 52,20% de cinzas são retidas, ao passo que para o leite 2 e concentrado proteico as perdas são maiores somente, 13,27% de cinzas são retidas para o concentrado proteico e cerca de 15,47% para o leite 2 .

Como a perda de proteína e de cinzas é menor para o leite 1 , é de supor que esses minerais devam estar ligados às proteínas de alguma maneira, talvez como grupo prostético ou coenzima.

Para as cinzas, a eficiência de remoção das mesmas com solução de K_2CO_3 é menor do que a eficiência da lavagem com água.

5 - RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho realizou-se na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, e as amostras utilizadas foram coletadas na destilaria da Usina Bom Jesus, situada no Município de Rio das Pedras, SP. Teve por objetivo estudar a produção de proteína de leveduras nas condições da indústria, bem como os fatores relacionados com a elevação do teor de proteína bruta no material industrial.

Foram conduzidos experimentos de fermentação para verificar a possível influência na natureza dos compostos nitrogenados e da variação da relação C/N na porcentagem de proteína bruta. Por outro lado, foi verificado o efeito de lavagens com água e solução de K_2CO_3 sobre os teores de proteínas das amostras retiradas em diferentes fases do processamento.

Dos resultados, foram obtidas as seguintes conclusões:

- O íon amoniacal (NH_4^+) no meio sintético elevou a porcentagem de proteína no meio quando comparado com o íon nitrato (NO_3^-).
- Em meios contendo 1% de glucose a porcentagem de proteína foi a mais elevada independentemente da fonte nitrogenada.
- A lavagem dos leites de levedura e do concentrado proteico com água ou solução de K_2CO_3 eliminou impurezas, concentrando a proteína.
- Durante o processo de lavagem há perda de proteínas, maiores para o concentrado proteico e leite termolísado, e menores para o leite não termolísado.
- As menores perdas de proteínas pela lavagem correspondem também as menores perdas de minerais, sugerindo alguma ligação entre ambos.

6 - SUMMARY

The present work was carried out at Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", of Universidade de São Paulo, and the samples were collected at the Usina Bom Jesus, located at Rio das Pedras, SP. Its objective was to study the production of single-cell protein (SCP) under industrial conditions, as well as to determine the factors related to the increase of total protein in the industrial material.

Fermentation experiments were conducted to verify the possible influence of the nature of the nitrogen source and of the variation of the C:N ratio on the percentage of total protein.

Also, the effect of washings with water and solution of K_2CO_3 on the protein content investigated, the washings being applied to samples collected during different phases of processing.

From the results, the following conclusions could be drawn:

- Ammonia as nitrogen source in synthetic medium increased the protein percentage as compared to nitrate.
- Media with 1% glucose produced the highest protein content, independent of the nitrogen source.
- Washings of milk yeasts and the protein concentrated with water and K_2CO_3 solution eliminated impurities ; concentrating the protein.
- During the washing process there are losses of protein which are greater for commercial yeast and thermolized yeast milk and smaller for non thermolized yeast milk.
- Lower protein losses during washings correspond to lower losses of mineral salts, suggesting some kind of linkage between them.

7 - BIBLIOGRAFIA CITADA

- ABISON, G. *et alii*, 1968. Proteolyse par la levure. Ind. agric. et alim. 76: 651-55.
- ADRIAN, J. e R. FRANGNE, 1970. Valeur protidique de la levure torula en fonctions des modalités thermiques du chauffage. Ind. agric. et alim. 87: 393-9.
- BAILEY, J. L., 1967. Techniques in protein chemistry. 2 ed. Amsterdam, Elsevier, 340-52.
- BOURDET, A., 1949. Étude et mesure du pouvoir fermentaire des levures hautes pressées de boulangerie en fonction de la présence de divers éléments nécessaires à leur activité ou susceptibles de l'accroître. Ind. agric. et alim. 66: 531-37.

- BROQUIST, H. P. *et alii*, 1961. Biosynthesis of lysine from a Ketoacid and an aminoadipic acid in Yeast. Appl. microb. 9: 1-5 .
- CANEPA, A. *et alii*, 1972. A method for large reduction of the nucleic acid content of Yeast. Biotech. and Bioeng. 14: 173-77.
- DESMONTS, R., 1966. Tecnologia da produção de fermentos. Bol. Inform. da A. P. M. Piracicaba, 5: 1-11.
- DESMONTS, R., 1966. Proteína: Um problema alimentar. Valor nutritivo da levedura. Sua utilização prática para a alimentação humana. Bol. Inform. da A. P. M. Piracicaba, 8: 1-13.
- DIFCO MANUAL of by treated culture media and reagents for microbiological and clinical laboratory procedures. Ninth edition, Michigan, 1953.
- EDEBO, L., 1960. A new press for the discription of microorganism and other cells. Biotech. and Bioeng. 4: 453-79.
- FALANGHE, H., 1975. Produção de microorganismos como fonte de proteína. In: LIMA, U. A. ; E. AGUARONE e W. BORZANI, Coord. Tecnologia das Fermentações. São Paulo, Edgard Blucher Editora. p. 254-83.
- HEDENSKOG, G. *et alii*, 1970. A method for obtaining protein concentrates from microorganisms. Biotech. and Bioeng. 12: 947-59.
- HOFSTEIN, B. V. e A. TJEDER, 1961. The desintegration of yeast with dry ice and some properties of the extracts. Biotech. and Bioeng. 3 (2): 175-80.

- HUGHES, D. E., 1961. The disintegration of bacteria and other microorganisms by the M. S. E. MULLARD ULTRASONI Disintegrator. Biotech. and Bioeng. 3 (4): 405-53.
- JENSEN, A. L. e P. SHU, 1961. Production of lysine rich Yeast. Appl. microb. 9: 12-15.
- KRETZSCHMAR, H., 1961. Levaduras y alcoholes. Reverté, S. A., 54-61.
- LE FRANÇOIS, L., 1961. De la valorization d'eaux residuales au moyen de la culture de levure aliment. Ind. agric. et alim. 78: 291-98.
- LE FRANÇOIS, L., 1964. Development in continu de la levure et outres microorganisms. Ind. agric. et alim. 81: 513-17.
- MCMANUS, I. R., 1954. The biosynthesis of valine by *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 208: 639-44.
- PIMENTEL GOMES, F. 1970. Curso de Estatística Experimental. 4^a ed., São Paulo. Livraria Nobel. 515 p.
- REHÁČEK, J. *et alii*, 1969. Disintegration of microorganisms and preparation of Yeast cell walls in a new type of desintegrator. Appl. microb. 17: 462-66.
- TANNENBAUM, S. R. e S. A. MILLER, 1967. Effect of cell fragmentation on nutritive value of *Bacillus megaterium* protein. Nature 214: 1.261-62.
- VOSTI, D. E. e M. A. JOSLYN', 1954. Autolysis of Baker's Yeast. Appl. microb. 2: 70-78.

VOSTI, D. E. e M. A. JOSLYN, 1954. Autolysis of Several pure culture Yeast. Appl. microb. 2: 79-84.

WALLER, J. R., 1970. Aminoacid induced inhibition and estimation of *Saccharomyces carlsbergensis*. Appl. microb. 20: 857-60.