UTILIZAÇÃO DO LICOR RESIDUAL DA PRÉ-HIDRÓLISE DO BAGAÇO DE
CANA-DE-AÇÚCAR PARA A PRODUÇÃO DE PROTEÍNA MICROBIANA POR
Aspergillus niger van Tieghem

TÂNIA LÚCIA MONTENEGRO STAMFORD

Orientador: *Prof. Dr. Rodolpho de Camargo*

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

P I R A C I C A B A
Estado de São Paulo - Brasil
março, 1979

A meus queridos pais,
JOSÉ e IVONE MONTENEGRO

Meu profundo reconhecimento
pelos sacrifícios realiza-
dos, pela tenacidade e per-
severança na minha formação
escolar.

A meus irmãos,
GLIELSON e EDUARDO

OFEREÇO, como exemplo.

A NEWTON,

esposo, amigo e companheiro,

A THAYZA CHRISTINA e THATIANA,

minhas filhas,

Razão da minha vida,

DEDICO ESTE TRABALHO.

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

Sinceros agradecimentos a todos que contribuíram para a realização desse trabalho e em especial:

Ao Prof. Dr. Rodolpho de Camargo, pelo apoio, orientação e alto espírito humanitário que lhe é peculiar;

Ao Prof. Dr. Luiz Ernesto George Barrichelo, pelas sugestões e fornecimento do material base empregado na presente pesquisa;

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação de Microbiologia Agrícola da ESALQ, pela contribuição para minha formação científica;

Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, pelo estímulo concedido na realização do Curso;

À U.F.R.PE., na pessoa de Dr. Júlio de Carvalho Fernandes, pela confiança depositada no nosso trabalho;

À Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela ajuda financeira, sem a qual tudo seria mais difícil;

Ao Prof. Dr. Henrique Vianna de Amorim e à estagiária Regina Maria Dias, do Departamento de Química da ESALQ, pela colaboração nas análises de laboratório;

Aos Professores Dr. Luiz Gonzaga do Prado Filho e Dr. Jorge Horii, pela prestimosidade e amizade sempre demonstradas;

Ao Prof. Dr. Mark. L. Woolfe do Instituto de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco e Sra. Margareth Wagner, funcionária da Diretoria da ESALQ, pela ajuda na elaboração do texto em inglês;

Aos Professores Dr. Murilo Graner e Dr. Homero Fonseca, pelas facilidades concedidas no uso do laboratório do setor de Bioquímica e Processamento de Alimentos do Departamento de Tecnologia Rural da ESALQ;

Ao Prof. Dr. Otto Jesu Crocomo do Setor de Bioquímica do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da ESALQ - USP, pela realização das análises de aminoácidos;

Aos Professores Israel Pereira da Silva e José Aleixo da Silva, pela valiosa colaboração nas Análises Estatísticas;

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação, pelo convívio e constante estímulo;

À Lúcia, bibliotecária do Departamento de Tecnologia Rural e ao funcionário Sr. Luiz da Biblioteca Central, pelo carinho e atenção;

Aos funcionários do Departamento de Tecnologia Rural da ESALQ pelo auxílio dispensado na condução dos experimentos;

Finalmente, a DEUS, por tudo.

Í N D I C E

	Página
1. RESUMO	1
2. INTRODUÇÃO	4
3. REVISÃO DE LITERATURA.	8
3.1. Produção de Alimento Protéico por Microrganismos...	8
3.2. Características Gerais do <i>Aspergillus niger</i> van <i>Tieghem</i>	13
3.3. Aproveitamento de resíduos industriais.	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1. Obtenção do Licor Utilizado	27
4.2. Tratamento do Licor	28
4.3. Análise dos Licores	28
4.3.1. Análises físicas e químicas.	28
4.3.2. Análise qualitativa e quantitativa dos açú- cares nos licores.	29
4.4. Material Biológico.	32
4.4.1. Seleção do microrganismo	32
4.4.1.1. Resistência ao furfural	34
4.4.1.2. Crescimento em meio líquido	34
4.5. Instalação dos Experimentos	34
4.5.1. Local	34
4.5.2. Linhagem utilizada	35

4.5.3. Meio de Cultivo	37
4.5.4. Crescimento da cultura e padronização do inóculo	37
4.5.5. Inoculação e incubação.	38
4.5.6. Filtração e peso da matéria seca do micélio .	38
4.5.7. Delineamento Experimental e Análise Estatís- tica	40
4.5.8. Análises Químicas.	40
4.5.8.1. Determinação de nitrogênio e protef- na	40
4.5.8.2. Análise dos Aminoácidos.	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
5.1. Ensaios Preliminares.	45
5.2. Experimentos com o Licor	48
5.2.1. Produção de massa micelial.	48
5.2.2. Produção de Proteína.	60
5.2.3. Análise dos aminoácidos	64
6. CONCLUSÕES	67
7. SUMMARY	69
8. LITERATURA CITADA	71

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
01 - Análise física e química do licor tratado e do licor não tratado. (média de 2 repetições).	30
02 - Análise quantitativa dos açúcares presentes no licor tratado e no licor não tratado (média de 3 repetições).	31
03 - Quantidade de carbono nos açúcares do licor tratado e do licor não tratado.	33
04 - Tratamentos usados no ensaio preliminar para verificar a resistência dos fungos <i>A. niger</i> IZ-9, <i>F. moniliforme</i> IZ-1418 e IZ-2007 e <i>F. oxysporum</i> IZ-2008, a níveis crescentes de furfural.	35
05 - Substituição do meio líquido CHRISTIAS <i>et alii</i> (1975), usado como padrão, por concentrações crescentes do licor não tratado.	36
06 - Substituição pura e simples do meio sintético, pelo licor tratado e licor não tratado (V/V).	42
07 - Substituição pura e simples do meio sintético pelo licor tratado (V/V), mantendo constante o teor dos nutrientes, em função do existente no meio sintético.	43
08 - Substituição do meio sintético pelo licor tratado e não tratado (V/V), usados como fonte de carbono com níveis constantes e crescentes, sem alterar os teores de nutrientes, com e sem ajuste de pH. ^{a/}	44
09 - Resultado do ensaio para seleção de microrganismo, através da esporulação, ^{a/} em função de níveis crescentes de furfural.	46

TabelaPágina

10 - Resultado do ensaio para seleção de microrganismo produtor de biomassa, utilizando como substrato o licor residual da pré-hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar em substituição ao meio sintético. . . .	47
11 - Produção de massa micelial (g/62,5 ml), por <i>Aspergillus niger</i> , em função das concentrações de licor tratado e não tratado dentro de cada tratamento do licor ^{a/} (médias de 3 repetições).	49
12 - Produção de massa micelial (g/62,5 ml), por <i>A.niger</i> , em função dos tratamentos do licor ^{a/} , usando comparações em cada concentração do licor (média de 3 repetições).	50
13 - Resultados parciais da análise de variância do peso da massa micelial, percentagem de proteína e proteína total dos experimentos com diferentes condições nutricionais. ^{a/}	58
14 - Resultados parciais da análise de variância do peso da massa micelial, percentagem de proteína e proteína total, comparando os tratamentos do licor dentro de cada concentração. ^{a/}	59
15 - Percentagem de proteína produzida por <i>A. niger</i> , usando concentrações crescentes de licor tratado e não tratado, em função dos tratamentos do licor (média de 3 repetições).	62
16 - Produção de proteína total (g/l), por <i>Aspergillus niger</i> , em função das concentrações de licor tratado e não tratado e dos tratamentos do licor (média de 3 repetições).	63
17 - Composição de aminoácidos (g/100 g proteína) no micélio de <i>A. niger</i> crescido em meios com quantidades crescentes de licor e diferentes teores de carbono total, com nutrientes e pH ajustados.	65

TabelaPágina

18 - Comparação dos aminoácidos essenciais em <i>A. niger</i> , <i>Candida utilis</i> , <i>Bacillus sp</i> , ovo e exigências ne- cessárias para crianças.	66
--	----

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
01 - Crescimento do <i>A. niger</i> em meio completo para <i>Aspergillus</i> , (CHRISTIAS <i>et alii</i> , 1975).	39
02 - Padronização do inóculo através de discos de ágar com 5mm de diâmetro cortados da periferia da cultura jovem (6 - 8 dias).	39
03 - Crescimento de <i>A. niger</i> em função da adição de <u>li</u> cor tratado e não tratado, em substituição pura e simples ao meio sintético.	52
04 - Crescimento de <i>A. niger</i> em função da adição de <u>li</u> cor tratado e não tratado em substituição ao meio sintético, comparado com a substituição com balan <u>ce</u> amento de nutrientes.	55
05 - Crescimento de <i>A. niger</i> , em função da adição de <u>li</u> cor com e sem ajuste do pH, mantido constante o teor de nutrientes.	56
06 - Curva de regressão entre o teor de carbono do <u>li</u> cor e o peso da massa micelial de <i>A. niger</i> , crescendo em concentrações crescentes do licor. . . .	57

1. RESUMO

Experimentos foram conduzidos visando o aproveitamento, total ou parcial, do licor residual da pré-hidrólise do bagaço da cana-de-açúcar como matéria prima para a produção de proteína monocelular. Concentrações crescentes de licor tratado e não tratado, em substituição ao meio sintético, e diferentes condições nutricionais do licor, foram utilizadas. Com base em ensaios preliminares foi selecionado e usado como microrganismo teste o fungo *Aspergillus niger* van Tieghem, catalogado na Micoteca do Instituto Zimotécnico da ESALQ-UPS sob o número IZ-9.

Todos os experimentos foram conduzidos obedecendo ao esquema experimental inteiramente casualizado, com três repetições. Procedeu-se a determinações do peso da matéria seca do micélio, teor e produção de proteína total, e análise quantitativa dos aminoácidos.

Foi observada uma diferença altamente significativa das concentrações crescentes do licor e entre as diferentes condições nutricionais ensaiadas. A melhor concentração, quando em substituição pura e simples, foi de 40% tanto para o licor tratado como para o não tratado. A maior produção de biomassa foi obtida quando utilizado licor tratado com carbono e nutrientes balanceados e pH ajustado a 5,0.

Considerando-se a substituição pura e simples, o licor tratado possibilitou a produção de massa micelial por *Aspergillus niger* van Tieghem até o nível de 90%, enquanto o licor não tratado inibiu o crescimento do fungo a partir do nível de 45% de substituição.

Os resultados dos experimentos com diferentes condições nutricionais mostraram que o principal fator limitante do crescimento fúngico foram os nutrientes, com indicação de certa influência do pH.

Foi observada uma correlação altamente significativa entre o carbono cedido pelo licor e a produção de bio-massa, sugerindo que o mesmo pode ser usado como fonte de carbono para o crescimento de *Aspergillus niger* van Tieghem.

O efeito das concentrações do licor tratado e não tratado na produção de proteína total foi também verificado, sendo os resultados sempre crescentes com o aumento da concentração

do licor. Finalmente, foi observado o efeito das concentrações do licor na qualidade protéica, avaliada pela análise dos amino-ácidos, com os teores mais altos no nível de 40% de substituição usando o licor tratado, com carbono e nutrientes balanceados e pH ajustado a 5,0.

2. INTRODUÇÃO

É grande a preocupação do mundo moderno com a produção de alimentos e à medida que cresce a população mais cresce a demanda, em proporção cada vez maior que a oferta. De acordo com estatísticas da FAO, a produção agrícola aumentará em 28% até 1983 mas a população deverá dobrar até as proximidades do século 21.

Novas técnicas agropecuárias, aproveitamento de áreas inexploradas ou tidas como não utilizáveis, são os artifícios utilizados para aumentar a produtividade e a produção de gêneros alimentícios. Incentivo da pesca, incremento do consumo de pequenos animais, métodos especiais de criação de gado, consumo de concentrados protéicos vegetais de elevada qualidade são algumas das técnicas propostas que abrem novos campos à produção de alimentos.

Ao lado das fontes convencionais de produção de alimentos, surge uma nova possibilidade: a utilização de microrganismos

mos como produtores de proteínas e vitaminas, cujos valores nutritivos assemelham-se muito, aos dos alimentos normalmente utilizados, nas dietas animal e humanas.

O interesse no estudo dos microrganismos produtores de alimentos não se limita ao aspecto produtividade, mas procura auxiliar a solução de outro grande problema deste século: a poluição ambiental. A esse respeito os microrganismos agiriam como destruidores de resíduos da indústria e agricultura, que normalmente seriam desprezados pelo homem, e que no entanto, podem ser transformados pela ação dos microrganismos em componentes altamente nutritivos.

No Brasil, atualmente, a matéria prima mais importante é melaço de cana-de-açúcar, seguindo-se os resíduos de destilaria.

Em outros países, os melaços de beterraba, os licores sulfíticos de fábricas de papel, resíduos lenhosos de indústria de madeira, sabugos de milho, casca de aveia, alinham-se como importantes matérias-primas de baixo preço de aquisição.

Em países onde a indústria petroquímica está bem avançada, as pesquisas se intensificaram na busca de microrganismos capazes de sintetizar proteínas a partir de hidrocarbonetos como fonte de carbono.

Na IV Conferência sobre os Impactos Globais da Microbiologia Aplicada (GIAM-IV) em 1973, muitos trabalhos foram apre-

sentados sobre a produção de proteínas pela conversão de hidrocarb^obonetos, os quais refletem o estágio atual das pesquisas sobre o assunto.

Embora a alimentação no Brasil seja deficiente em muitas regiões, por ser constituída, geralmente, de alimentos de baixo valor protéico e vitamínico, não houve ainda uma produção sistemática e em escala industrial de proteína monocelular. Algumas tentativas de produção nas regiões norte e sul do país foram abandonadas por não haver, por parte dos consumidores, conhecimento real do produto.

Um ponto importante a ser salientado é que os microrganismos apresentam uma velocidade de multiplicação celular aproximadamente 500 vezes maior que a dos produtos agrícolas e 10.000 vezes maior que a do gado. Isso significa que os microrganismos são melhores conversores que as plantas e os animais, pois são capazes de produzir proteína a partir de hidratos de carbono e sais de amônio, de forma análoga às plantas cultiváveis, que a produzem pela assimilação dos sais empregados como adubo. Contudo, as plantas necessitam de um ciclo vegetativo longo, enquanto que as leveduras e as bactérias podem produzir proteína em poucas horas e, ainda, em uma forma mais concentrada. Além disso, os fatores climáticos, que são decisivos para a produção agrícola, não interferem no crescimento dos microrganismos. A produção da proteína monocelular é conseguida em locais que tomam pouco espaço, com características de uma indústria moderna, em equipamentos que permitem um controle rigoroso de produção.

O presente trabalho foi realizado tendo como base um projeto que está sendo desenvolvido na ESALQ-USP, visando o aproveitamento do bagaço da cana-de-açúcar como matéria prima para produção de celulose, rayon e proteína. Usamos o licor residual da pré-hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar, com vistas à produção de proteína monocelular, procurando contribuir não somente para resolver os problemas de nutrição mas também como tentativa para solucionar os problemas da poluição por deposição dos resíduos que afligem os grandes centros industriais.

3. REVISÃO DE LITERATURA

Esta revisão, para cobrir os propósitos do presente trabalho, será dividida em três itens: Produção de Alimento Protéico por Microrganismos, Características Gerais do *Aspergillus niger* van Tieghem e Aproveitamento de Resíduos Industriais.

3.1 - Produção de Alimento Protéico por Microrganismos

Uma grande parcela dos alimentos que têm contribuído para a nutrição do homem, vem sendo obtida através das atividades dos microrganismos, cujos exemplos mais conhecidos são: pão, queijo, iogurte, cacau, molho de soja, vinagre e bebidas alcoólicas. Na maioria dos casos, esses produtos são apenas o resultado da atividade bioquímica dos microrganismos. Algumas vezes, os próprios microrganismos são ingeridos juntamente com os seus produtos, contribuindo assim, com grande parcela do valor nutritivo, que consiste, principalmente, de um alto teor protéico e vitamínico.

Os nativos da República do TCHAD, na África, vêm desde tempos remotos, cultivando a alga verde-azul, *Spirulina máxima* fornecedora de proteína de alto valor nutritivo.

O homem aprendeu a utilizar certos cogumelos superiores, como os *Agaricus* e os *Boletus*, em sua alimentação, desde a mais remota antiguidade. Estas espécies continuam, atualmente, muito apreciadas em numerosos países e seu emprego como parte integrante da dieta, vem sendo difundido cada vez mais. Sua cultura está em contínua expansão e, beneficiada agora pela moderna tecnologia, atinge índices bastante elevados.

Nos dias de hoje, além desses cogumelos devemos incluir sob a denominação de "fungos comestíveis" as leveduras, o micélio de certos *Fungi imperfecti* e o próprio micélio dos cogumelos superiores, dos quais apenas o carpóforo era usado para fins alimentares. Estes fungos vêm sendo estudados como produtores de alimentos em grande escala, com vistas à necessidade de produção rápida de proteínas, para fazer frente ao grande crescimento demográfico de nossa época. Ao lado das chamadas fontes semi-convenacionais de proteínas, constituídas por concentrados protéicos de peixe, farinha de soja, algodão, etc., cuja disponibilidade potencial possui limitações devido à quantidade que se exige, surgem as fontes não convencionais de proteínas comestíveis, representadas por algas, bactérias, leveduras e fungos filamentosos.

A produção sistemática da proteína monocelular em escala industrial ocorreu na Alemanha, no decorrer da Primeira

Grande Guerra, culturas puras de *Torulopsis* foram usadas para a alimentação humana, quando da necessidade crítica de proteínas (HANNEBERG, 1926).

A partir do trabalho de TAKATA (1929), os microrganismos despertaram grande interesse como fonte de proteínas. Várias espécies foram analisadas quanto ao teor de proteínas e também quanto à sua qualidade, como mostraram CLUITERBUCK *et alii*, 1932.

A matéria seca dos microrganismos, com altos teores de aminoácidos essenciais, está sendo utilizada em vários países como os Estados Unidos da América do Norte, a Inglaterra, França, Japão e a Rússia, com a finalidade de suplementar a dieta cereal dos animais, tendo em vista que a maioria dos cereais, componentes dessas rações, possuem baixas concentrações dos principais aminoácidos, especialmente lisina e triptófano.

Em 1946 VON LOESECKE considerou que, a princípio deve-se utilizar as leveduras, principalmente *Torula* sp, para suplementar deficiências de aminoácidos e vitaminas dos grãos de cereais. Além do seu alto conteúdo protéico, as leveduras são uma das fontes mais ricas de vitaminas do complexo B e contêm grandes quantidades de minerais essenciais.

THATCHER (1954), apresentou uma revisão sobre as substâncias de valor nutricional produzidas pelas leveduras e sua contribuição na suplementação dos alimentos que apresentam deficici

ências específicas. Este mesmo autor considerou a possibilidade do uso de microrganismos como fonte alimentar fundamentada em três aspectos principais: a necessidade crítica de alimentos, particularmente os protéicos; as vantagens econômicas da elaboração de alimentos ou vitaminas a partir de matérias-primas relativamente baratas; e a redução dos custos de produção das indústrias disponíveis de produtos de fermentação.

No melhoramento para caracteres quantitativas em leveduras, JAMES *et alii* (1965) descreveram que o objetivo de aumento da produção poderia ser alcançado pela técnica da mutação seguida da seleção e TANNENBAUM e MILLER (1967), mostraram que outros aspectos poderiam também ser levados em conta, no sentido de melhorar a qualidade de proteínas monocelulares. Estes pesquisadores demonstraram que a parede celular intacta limita o valor nutritivo da proteína monocelular obtida de *Bacillus megaterium*. Por uma técnica de fragmentação celular adequada à preparação em larga escala, mostraram que o valor nutritivo pode ser aumentado.

WASLIEN *et alii* (1968), citam um obstáculo para o uso de proteínas de microrganismos para o consumo humano: a biomassa protéica tem um conteúdo relativamente alto de ácidos nucleicos. Estes mesmos autores em 1969, examinando a tolerância humana a alimento produzido por bactérias, encontraram distúrbios gastrointestinais, supostamente devido a alguma substância da parede celular. Já EDOZIEN *et alii* (1970), não encontraram estes inconvenientes quando administraram alimento produzido por levedura.

CAMARGO (1978) em excelente revisão sobre os aspectos nutricionais dos produtos de SCP ("Single Cell Protein") mostra que os principais problemas ocorrentes são: presença de fatores tóxicos nas células de algas e bactérias; alto teor de ácido nucléico em todos os microrganismos; e menor digestibilidade.

Segundo HEDEN e MOLIN (1971), o conteúdo de ácido nucléico nas células microbianas, pode ser reduzido com o desenvolvimento de métodos econômicos para extração em larga escala de ácidos nucléicos e nucleotídeos de microrganismos, contribuindo para incrementar o uso da biomassa de leveduras e bactérias para o consumo humano. Alguns trabalhos têm sido realizados neste sentido, como o de MAUL *et alii* (1970), os quais usando processos enzimáticos de redução de ácido nucléico chegaram a remover mais de 85% dos ácidos nucléicos de leveduras.

A busca de novas fontes de produção de alimentos, além das convencionais, têm sido constante nos últimos anos, motivada pela falta de alimentos e principalmente pelo aumento populacional, (BHATTACHARJEE, 1970). Este mesmo autor afirmou que os microrganismos são importantes como fonte potencial de alimentos, porque o material celular microbiano é especialmente rico na maioria das vitaminas do grupo B e em proteínas que contêm aminoácidos essenciais. Além disso, os microrganismos podem contribuir para o enriquecimento potencial das dietas deficientes, desde que suas proteínas são comparáveis com fontes protéicas convencionais como: ovos, leite, carne e peixe em termos de todos os padrões de nutrientes.

Além das vantagens já citadas, acrescentam-se outras inerentes ao microrganismo. Assim, KIHLEBERG (1972) comentou que os microrganismos têm um tempo de geração muito curto, podendo fornecer rápidos aumentos de massa; podem ser, com facilidade, modificados geneticamente; o seu crescimento e produtividade independem de mudanças climáticas; e alta produtividade pode ser conseguida em espaços relativamente pequenos.

Uma perfeita revisão sobre o assunto poderá ser encontrada em TAVARES (1974) que focalizou a questão sob dois aspectos principais: produção de alimento protéico por microrganismos, visando o seu emprego na alimentação humana, e considerações sobre o melhoramento das espécies microbianas, a exemplo do que se faz nas plantas e animais superiores.

Naturalmente, mais pesquisas serão necessárias visando transformar a produção microbiana em alimentos aceitáveis e adequados para o uso nas dietas animais e humanas mas, os dados confirmam a certeza de que, um novo horizonte se abre para a solução do problema da fome, que existe em muitos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento.

3.2 - Características gerais do *Aspergillus niger* van Tieghem.

Aspergillus niger van Tieghem possui conídios predominantemente binucleados (60 a 80%), seu ciclo vital é rápido, podendo crescer em meios de composição definida como em meios mais complexos. O ciclo sexual é ausente, mas é possível fazer-se análise

ses genéticas através do ciclo parassexual (PONTECORVO, 1952; PONTECORVO *et alii*, 1953). A haploidização mitótica de deplóides pode ser induzida através de para-fluorfenilalanina (LHOAS, 1961; 1967; 1968) facilitando desse modo a análise genética.

STEINBERG em 1939 estudou a influência de diversos compostos no crescimento de linhagem de *Aspergillus niger* van Tieghem em meio de cultura líquido, sendo o crescimento estimado pelo peso da matéria seca do micélio. O autor verificou que a adição de extrato de leveduras em meio com sacarose aumentou o crescimento, assim como a adição de peptona em meio com glicerol. Atribuiu estes efeitos à presença de elementos contaminantes não identificados nos compostos adicionados.

O fungo *Aspergillus niger* van Tieghem apresenta vantagens sob o ponto de vista industrial, uma vez que é largamente usado para a produção comercial de ácido cítrico.

A produção de ácido cítrico por fermentação é conhecida desde que WEHMER (1893) citado por PERLMAN e SIH (1960) relatou a sua ocorrência em *Citromyces pfefferians* e *C. glaber*, fungos que são atualmente classificados no gênero *Penicillium*. Depois deste trabalho pioneiro, outros fungos, principalmente espécies do gênero *Aspergillus*, foram relatados como acumuladores desse importante metabólito.

Atualmente linhagens selecionadas de *A. niger*, em condições apropriadas, são as responsáveis por quase toda a produção

mundial de ácido cítrico, que é estimada em 90.000 toneladas anuais (LOCKWOOD, 1975). A sua importância pode também ser evidenciada pela grande utilização nas indústrias de alimentos, refrigerantes e farmacêuticas.

As indústrias de fermentação, inclusive no campo das vitaminas, evoluíram rapidamente durante e após a Segunda Guerra Mundial, com o uso de novos microrganismos mais produtivos e de técnicas mais precisas e avançadas (VOGEL, 1950).

Microrganismos que produzem diretamente o ácido ascórbico, são, entre outros, o *Bacillus prodigiosus* e o *Aspergillus niger* (VAN LANEN e TANNER, 1948).

Muitas enzimas microbianas comercialmente úteis têm sido produzidas por linhagens do grupo *Aspergillus*. Entre estas podemos citar as enzimas pectinolíticas, largamente empregadas na indústria de alimentos (ENDO, 1962), e as enzimas amilolíticas como a d-amilase fúngica estudada por BALANKURA *et alii*, 1946; POOL e UNDERKOFER, 1953; PARK *et alii*, 1971.

Recentemente, maior atenção às condições de má e de subnutrição, a que estão sujeitos largos contingentes de população, associada a prognósticos autorizados e pouco tranquilizadores concernentes ao problema do aumento populacional frente às dificuldades de correspondente aumento da produção de alimento, têm despertado profunda preocupação. Esta resultou num grande volume de trabalhos buscando fontes não usuais de proteína. Entre estes,

os que se referem ao desenvolvimento de microrganismos como fontes potenciais de proteína são bastante numerosos. Microalgas, bactérias, leveduras e fungos têm sido extensivamente estudados e a vantagem da produção de proteína microbiana sobre a produção de proteína animal e vegetal tem sido realçada.

Há contudo, indicações na literatura que os fungos filamentosos possuem certas características tais como: rápida velocidade de crescimento e textura, os quais os fazem preferíveis em casos particulares. Entre fungos filamentosos as espécies de *Aspergillus* e *Fusarium* estão entre as mais estudadas neste sentido (SPICER, 1971; SEKERI - PATARYAS *et alii*, 1973).

HANG *et alii* (1975), verificaram que o *Aspergillus niger* foi capaz de converter rapidamente cerca de 97% do açúcar do licor residual de cervejaria para massa fúngica. A produção de micélio seco baseado no açúcar consumido foi aproximadamente 57%.

3.3 - Aproveitamento de resíduos industriais

Os resíduos industriais e agrícolas, que de outro lado se constituem em problemas ambientais, são exemplos de substratos para a produção de biomassa (CAMARGO, 1978).

Muitos fungos, graças à complexidade de seus sistemas enzimicos, podem utilizar vários substratos, como lignina, celulose, hemicelulose, pectina e outros polímeros, além de hexoses e pentoses. Podem também, multiplicar-se em substratos glicídicos.

cos, que existem em grande quantidade em muitos países, freqüentemente como resíduos industriais ou subprodutos, tais como: melaço, vinhaça e licores sulfíticos residuais.

BLOCK *et alii*(1953), mostraram a possibilidade de produzir micélio de *Agaricus blazei* em cultura submersa, usando água resultante de prensagem de cítricos, bem como em meios sintéticos. O micélio assim obtido mostrou ter o mesmo valor nutritivo que as leveduras.

REUSSER *et alii*, em 1953 e 1961, estudaram a concentração de proteínas e gordura em 10 espécies de cogumelos cultivados em meio sintético, no melaço e em licor sulfítico. Verificaram que maiores concentrações de nitrogênio no meio de cultura favoreciam a produção de proteínas. A *Morchella hybrida* e o *Tricholoma nudum* foram os que apresentaram maior conteúdo protéico(37%). O micélio seco deste último apresentou o mesmo conteúdo protéico e vitamínico das leveduras. Suas vitaminas foram suficientes para manter o crescimento normal de camundongos, quando o micélio seco era adicionado a ração numa concentração ao nível de 5%.

No Brasil, FALANGHE (1962) estudou a utilização do melaço e da vinhaça, subprodutos respectivamente da indústria do álcool e aguardente. Entre as variedades de *Agaricus*, *Boletus* e *Tricholoma* empregadas, conseguiu, em cultura submersa, altos rendimentos em micélio e proteínas com *A. campestris*, *B. indecisis* e *T. nudum*.

Embora, como até aqui relatado, vários cogumelos te

nham sido desenvolvidos com sucesso em sua forma micelial, em cultura submersa, apenas *Agaricus* sp e *Morchella* sp foram cultivados em larga escala em fermentadores-piloto e dos dois, apenas o último é explorado comercialmente (KLIS, 1963).

FALANGHE *et alii*, 1964, trabalharam com soro de soja envolvendo a produção de micélio de *Tricholoma nudum* e verificaram que a fonte de nitrogênio utilizada no meio de cultura também influi sobre a forma em que o micélio é produzido.

Além do micélio de cogumelos, micélio de outros fungos têm sido estudados com relação a sua composição em proteína. Assim, em época bem anterior ao desenvolvimento do interesse da produção de micélio de cogumelos em cultura submersa, vários fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* foram estudados com relação a seu conteúdo de proteína e gordura.

THATCHER (1954), em sua revisão sobre alimentos de fungos, descreveu uma série de trabalhos que trataram de substratos usados para produção de alimento microbiano. A esse respeito, foram citados como substratos para leveduras: restos de queijaria e soro, resíduos de bebida alcoólica, hidrolizado de madeira, melaço e resíduos da agricultura. Nos experimentos, nos quais esses substratos foram utilizados, a *Torula utilis* foi considerada a espécie mais produtiva.

Em 1946, HEINES e NORD, descreveram um sistema muito interessante que envolve uma associação de microrganismos, Fu-

sarium lini e leveduras, com bons resultados na fermentação do hidrolisado de madeira.

HARRIS e JOHNSON (1948), apresentaram um processo modificado de hidrólise da madeira para produção de açúcares, onde 50-85% são fermentáveis por espécies de *Saccharomyces*, 90 - 95% por espécies de *Torula*, *Monilia* ou *Candida* e 95-96% por *Clostridium* ou *Aerobacter*.

Em 1951, INSKEEP *et alii* descreveram uma fábrica nos EUA onde *Torula utilis* foi a espécie usada para se obter um produto de alto conteúdo vitamínico e cerca de 50% de proteína.

SANCHEZ-MARROQUIN *et alii*, 1966, trabalharam com o suco de diversas espécies de agave suplementado com sais de amônio, o qual mostrou-se um bom substrato para as leveduras *Saccharomyces carbagali*, *C. utilis* e *C. parapsilosis*.

MOR e FIECHTER, 1968, estudaram o crescimento de *S. cerevisiae* em etanol sob várias condições. Foram medidos a matéria seca, concentração do substrato e o conteúdo de proteínas. Encontraram que um aumento na produção resultou da adição de ácido glutâmico ao meio.

As expensas do licor sulfítico, hidrolisado de celulose e melaço, segundo estima HODGERHEIDE (1969), no mundo se produzem aproximadamente 200.000 toneladas anuais de leveduras.

BHATTACHARJEE (1970), salientou em sua revisão so-

bre o assunto, que na Inglaterra cerca de 30.000 toneladas de leveduras desenvolvidas sobre resíduos de cervejaria, são usadas anualmente para alimentação animal, extrato de levedura e suplementação de dietas.

Além do alto valor alimentar KIHLEBERG (1972) descreve outra grande vantagem do uso de leveduras na alimentação, que é a sua capacidade em utilizar como substrato resíduos de indústria e agricultura de baixo custo que contribuem para a poluição ambiental.

Um estudo comparativo entre as leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, *C. utilis* e *C. pelliculosa* foi feito por NAWAWY e FOUDA (1973), para a produção de proteína a partir de melaço. Fazem estimativas dos custos de produção para o substrato usado e apontam que sua utilização contorna o problema da poluição.

SAVAGE *et alii* (1973), descreveram a conversão microbiana de dejetos de suínos para produção de ração, usando *C. utilis* e outras espécies e STESSEL, *et alii* (1973), completaram o trabalho. Neste mesmo ano, ARAÚJO NETO e PANEK, cresceram *C. utilis* em resíduos celulósicos das folhas de banana e JOKL e OLIVEIRA, estudaram o valor nutritivo de suplementos alimentícios produzidos por *S. cerevisiae*, em meio de milho.

Em 1964, GRAY *et alii*, investigaram quanto à possibilidade de se usar fungos imperfeitos para a produção de proteínas e encontraram que, esta classe de fungos, tem uma taxa rápida de crescimento e que também, pode utilizar uma variedade de

substratos. MORRIS *et alii* (1973), reportaram o cultivo de *Aspergillus niger* em cultura submersa para a produção de ração animal.

CHRISTIAS *et alii* (1975) estudaram o crescimento do micélio de duas estirpes de *A. niger*, e uma estirpe de *F. oxysporum* e uma estirpe de *F. moniliforme*, comparando com *C. tropicalis*. Através da avaliação do teor protéico e determinação dos aminoácidos dos micélios verificaram ser viável a substituição da levedura por espécies filamentosas para produção de proteína microbiana.

Alguns trabalhos têm sido publicados usando o resíduo de milho como substrato para o crescimento de fungos com a finalidade do seu uso na alimentação animal. RAJAGOPAL (1977), usou o sabugo de milho como substrato para o crescimento micelial de *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger* e *A. Tamarri*, com vista a produção de proteína, obtendo ótimos resultados.

MENEZES, *et alii* (1976), investigaram a produção de biomassa fúngica em substrato de bagaço de cana, mediante o emprego de diversas espécies de fungos celulolíticos. Concluíram que entre as linhagens estudadas, *M. verrucaria* NRRL 2003, *T. viride* Q M 6 a e *Geotrichum* 5 F produziram maior rendimento em biomassa protéica, sendo que a primeira foi superior às demais.

Na década de 1950, ROBERTS (1950, 1953), apontou a potencialidade das bactérias como produtoras de alimento. Culturas aeradas de *Escherichia coli*, usando glucose e sais de amônio como nutrientes, proporcionaram um suplemento protéico altamente

satisfatório para alimentação de ratos e galinhas. Porém somente a partir da década de 1960 é que a utilização de bactérias foi objeto de maior atenção, graças a possibilidade de emprego de derivados de petróleo como substrato, principalmente depois do trabalho de CHAMPAGNAT, *et alii* (1963). Estes autores mostraram que muitas espécies de microrganismos principalmente bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Hidrogenomonas*, *Methanomonas*, *Methylomonas*, *Pseudomonas*, eram capazes de crescer e se reproduzir ativamente às expensas de misturas de hidrocarbonetos, como a gasolina, n-alcanos refinados, gás natural e metano como também produtos da petroquímica como o metanol, etanol, ácido acético, etc. As células bacterianas obtidas nesse processo, apresentam um conteúdo satisfatório em aminoácidos e um teor médio de 73,62% de proteína em sua matéria seca.

JOHNSON (1967), descreve a situação da pesquisa dirigida para encontrar os microrganismos mais adequados e os procedimentos para a produção de células, a partir de vários tipos de hidrocarbonetos. Observa a possibilidade de utilização de bactérias e cita algumas vantagens que esses microrganismos poderiam apresentar sobre os microrganismos já produzidos com esse fim ou considerados promissores, como por exemplo, propagarem-se quatro vezes mais rapidamente que as algas, e certas espécies, tais como *Lactobacillus fermentans* e *E. coli*, podem conter mais de 80% de proteínas na massa celular seca. Essa excepcional velocidade de propagação e o excepcional conteúdo de proteínas foram, sem dúvida, os fatos que atraíram a atenção sobre esses microrganismos.

CALLIHAN e DUNLAP (1969) e HAN *et alii* (1970), cresceram com sucesso *Cellulomonas* em bagaço de cana-de-açúcar e concluíram que o uso do resíduo celulolítico como substrato para produção de proteína unicelular poderia encurtar o ciclo protéico celulósico/herbívoro e ao mesmo tempo oferecer uma solução para o problema da poluição ambiental.

Considerando que a utilização de celulose poderia a apresentar uma série de vantagens para a propagação de bactérias em relação a sua propagação em hidrocarbonetos, HAN *et alii* (1971), divisaram um processo em que *Cellulomonas* utilizada sozinha ou as associada com *Alcaligenes*, ambas isoladas do solo e com alta atividade celulolítica, são propagadas em celulose para obtenção de proteína celular. Ponderaram esses autores que a disponibilidade de celulose ultrapassa bastante a de hidrocarbonetos e que, na maioria dos países em desenvolvimento, onde há maior escassez de proteína, estes não são disponíveis em qualquer extensão, devido à inexistência de exploração petrolífera, enquanto que, por outro lado, celulose é largamente encontrada na forma de bagaços, cascas e caules. Além do mais, a fermentação de celulose para obtenção de proteína contribuiria sobremaneira para a solução do problema de eliminação dos resíduos celulósicos. Adicionalmente, salientam os autores que o desenvolvimento da tecnologia da fermentação da celulose traria benefícios que resultariam em rações de maior digestibilidade e em fibras de melhor qualidade para indústria de papel.

YANG *et alii* (1977) cresceram células de *Pseudomonas* JM 127 em meio contendo raspas de madeira mesquita (gênero *Prosopis*)

como única fonte de carbono. Determinaram o valor nutritivo da proteína microbiana e verificaram que esta proteína continha mais lisina e metionina do que o padrão da FAO/WHO (1973) e as exigências necessárias para crianças e adultos. As medidas de utilização da proteína líquida indicaram que o valor biológico da proteína das células microbianas intactas foi inferior ao da caseína. A utilização da proteína líquida e do nitrogênio digestivo foi significativamente aumentada quando as células foram mecanicamente homogeneizadas.

No Brasil se obtém os mais diversos subprodutos e resíduos celulósicos agroindustriais. Em virtude da imediata necessidade de produção de álcool carburante a partir de cana-de-açúcar avalia-se que, da quantidade de bagaço produzido e utilizado para alimentar as fornalhas das destilarias autônomas, haverá um excedente correspondente a 33%, CODISTIL (1976).

É fato conhecido que o bagaço não é uma matéria-prima uniforme. Em sua composição entram pelo menos dois tipos de materiais celulósicos: um fibroso, denominado fibra e outro não fibroso, chamado medula. A separação, parcial ou total das frações celulósicas, fibrosa e medular, é conseguida na prática industrial por um número relativamente grande de processos. A composição química do bagaço mostra ser o material rico em pentosanas. Estas, por hidrólise ácida produzem furfural que pode ser separado e concentrado por destilação.

Grande número de produtos químicos de utilização industrial são preparados a partir do furfural — o mais importante

aldeído alfa-derivado do furano. É um líquido incolor, de cheiro agradável, característico. É um produto de alta estabilidade térmica, quando protegido contra a ação do oxigênio. Reage com álcalis fortes (NaOH), segundo a reação Cannizaro, liberando álcool furfurfílico e sal sódico de ácido furóico. Como matéria-prima básica, citam-se resíduos de cereais contendo pentosanas, que dão um rendimento em furfural variando, os principais, entre 12 a 22%. O bagaço de cana-de-açúcar tem o conteúdo de furfural de 17% (QUEIRÓS *et alii*, 1967).

As propriedades e uso de furfural e a tecnologia de sua recuperação de resíduos resultantes da pré-hidrólise de madeiras na manufatura de polpa dissolvida são discutidas por KIN (1965).

FISCHGOLD *et alii*, 1964, investigaram as condições ideais para a pré-hidrólise de madeira. Pré-hidrólise a 165°C por 120 minutos produziu 81-3% de hidrolizado depois que o sulfato deu contagem de α celulose de 95% e pentosanas 5%. Para obter polpa com um maior teor foi necessário diminuir a produção hidrolítica para 76-9% pelo aumento da temperatura de hidrólise para 170%. Temperaturas acima de 170°C promoveu degradação da polpa.

STAKHORSKAYA em 1968, afirmou que, a concentração permissível de furfural para crescimento de leveduras em meio sintético é de 0,1 a 0,2% em meio hidrolizado.

Segundo o trabalho de PETROVIC (1969), em concentrações de furfural de 0,04-0,2% em meio sintético houve crescimento, assi

milação e atividade bioquímica de leveduras. A adaptação para quantidades crescentes de furfural (nesta faixa de percentual) foi realizada gradualmente. Testes comparativos da atividade metabólica foram realizados com espécies de leveduras e o autor notou que *Torulopsis utilis* var. *major* e *Torulopsis utilis* suportavam uma concentração mais alta de furfural do que a *Candida utilis*.

GUSANOVA (1970), observou que, o furfural quando adicionado 0,1% (V/V) em cultura de *C. tropicalis* inibiu a síntese protéica com respeito ao estado fisiológico das células de leveduras. Já AGRAWAL (1974) discute a viabilidade da extração de furfural e a produção de proteína unicelular do bagaço de cana-de-açúcar como também posterior processamento para produção de papel.

Todos esses estudos, visando a utilização de resíduos industriais, assumem aspectos importantes; de um lado, como medida sanitária e, de outro, devido à possibilidade dessa operação servir para obtenção de alimentos particularmente interessantes, como, por exemplo, a produção de proteínas com boas características de palatabilidade, que poderiam ser usadas como flavorizantes de outras fontes não convencionais de proteína, onde um dos problemas que dificultam seu consumo é o gosto estranho que possuem.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Para o conhecimento mais detalhado do microrganismo e do material a ser usado como substrato, foram realizadas análises e ensaios preliminares, com a finalidade de obter informações para a racionalização dos trabalhos definitivos.

4.1 - Obtenção do Licor Utilizado

Usou-se o licor residual do bagaço de cana-de-açúcar gentilmente cedido pelo Dr. Luiz Ernesto George Barrichelo, Professor-Assistente-Doutor do Departamento de Silvicultura, Seção de Química - Celulose e Papel - ESALQ-USP.

O licor foi obtido a partir do bagaço de cana-de-açúcar, pré-hidrolizado em um digestor rotativo - AUTOCLAVE REG-MED. Modelo AU/EA 20, com capacidade para 20 litros.

As condições da pré-hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar, foram as seguintes:

- Quantidade de bagaço seco ao ar = 500 g;
- Relação bagaço/água = 1:10 (Kg/1);
- Temperatura máxima = 170°C;
- Tempo à temperatura máxima = 30 minutos.

Após o cozimento, o licor residual foi recolhido através de uma serpentina de aço inoxidável refrigerada à água.

4.2 - Tratamento do Licor

Nos ensaios preliminares usou-se o licor nas condições de obtenção, aqui chamado de licor não tratado.

Tendo em vista constatar-se a ocorrência de furfural, e possivelmente outros compostos voláteis, interferentes no crescimento de microrganismos, resolveu-se proceder a eliminação do mesmo, obtendo-se assim o licor tratado.

O tratamento do licor consistiu de simples evaporação em fogo brando, reduzindo-se o volume inicial à metade, a fim de promover a eliminação de compostos voláteis como o furfural, retomando-se o volume inicial por adição de água destilada.

4.3 - Análise dos Licores

4.3.1 - Análise físicas e químicas

As análises apresentadas na Tabela 1 foram realizadas no Departamento de Silvicultura, Seção de Química - Celulose e Papel.- ESALQ-USP, seguindo os "Métodos Analíticos para Hidrolisa-

dos" (BARRICHELO, 1977), e no Departamento de Química usando os "Métodos de Análises de Resíduos de Usinas de Açúcar e Destilarias" (DA GLÓRIA e SANTA ANA, 1975).

4.3.2 - Análise qualitativa e quantitativa dos açúcares nos licores.

A determinação qualitativa e quantitativa dos açúcares presentes nos licores usados (Tabela 2) foi feita por Cromatografia de papel (AMORIM, 1976), usando-se para comparação com o Rf o solvente n-Butanol/ácido acético glacial/água na relação 4:1:0,5 (V/V).

As quantidades das amostras a serem aplicadas no cromatograma foram de 100 µl do licor tratado e 100 µl do licor não tratado. Como padrões utilizou-se sacarose, glicose, frutose, xilose e arabinose, sendo a quantidade usada de 150 µl.

Tabela 1. Análise física e química do licor tratado e do licor não tratado. (média de 2 repetições)

Análises	Licor Tratado	Licor não Tratado
<u>Físicas</u>		
Peso específico (20/20°C)	1,010	1,008
Densidade (g/cm ³)	1,004	1,004
Concentração de sólidos (g/l)	28,712	29,494
<u>Químicas</u>		
pH ^{a/}	3,48	3,43
% de cinzas sobre matéria seca	3,357	3,262
Teor de furfural (g/l)	0,192	2,256
Pentoses (g/l)	24,81	20,72
% de pentoses	86,42	70,25
% C	1,08	1,24
% N	1,01	1,01
% P	0,002	0,001
% K	0,030	0,032

^{a/} o pH foi determinado no ORION RESEARCH-model 601/digital IONALYZER.

Tabela 2. Análise quantitativa dos açúcares presentes no licor tratado e no licor não tratado (média de 3 repetições)

Açúcares	Licor Tratado		Licor não Tratado	
	conc.g/ℓ	% dos açúcares	conc.g/ℓ	% dos açúcares
sacarose	0,25	10,6	0,29	14,3
glicose	0,31	13,1	0,30	14,8
frutose e arabinose ^{a/}	0,15	6,4	0,09	4,4
xilose	0,69	29,2	0,44	21,7
polissacarídeos	0,80	33,9	0,75	36,9
oligossacarídeos	0,16	6,8	0,16	7,9
T O T A L	2,36	100,0	2,03	100,0

^{a/} A mancha da frutose e arabinose não separou quando corremos as amostras.

Com base nos resultados da determinação dos açúcares dos licores, calculou-se as quantidades de carbono existentes nos açúcares presentes no licor tratado e no licor não tratado (Tabela 3), com a finalidade de possibilitar o balanceamento do carbono como fonte de crescimento para os microrganismos.

4.4 - Material Biológico

A partir dos ensaios preliminares foi selecionado para a realização deste trabalho, o fungo *Aspergillus niger* IZ-9 da Micoteca do Instituto Zimotécnico do Departamento de Tecnologia Rural da ESALQ-USP, originário do Northern Regional Research Laboratory - USD - Illinois, onde tem o número NRRL-337.

4.4.1 - Seleção do microrganismo

Através da análise química verificou-se que o licor não tratado continha 2,25 g de furfural/1.000 ml. Trabalho realizado por STAKHORSKAYA em 1968, mostrou que a concentração permíssível de furfural, para crescimento de leveduras em meio sintético, é de 0,1% e PETROVIC (1969), demonstrou que houve crescimento, assimilação e atividade bioquímica de leveduras com concentrações de furfural de 0,04-0,2% em meio sintético e que a adaptação a doses crescentes de furfural nesta faixa de percentual foi realizada gradualmente.

Em vista disto, procuramos observar o crescimento dos fungos *Aspergillus niger* IZ-9 (NRRL-337), *Fusarium moniliforme* IZ-1418 e IZ 2007 e *Fusarium oxysporum* IZ-2008, todos da mico-

teca do Instituto Zimotécnico (ESALQ-USP), a níveis crescentes de furfural, tendo em vista que estas espécies miceliais, segundo o trabalho de CHRISTIAS *et alii* (1975), podem competir com leveduras para produção de proteína microbiana.

Tabela 3. Quantidade de carbono nos açúcares do licor tratado e do licor não tratado.

Açúcares	P.M.	C a r b o n o		
		% no açúcar	g/l licor	
			Tratado	Não Tratado
Sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$)	342	42,1	1,05	1,22
Glicose ($C_6H_{12}O_6$)	180	40,0	1,24	1,20
Frutose ($C_6H_{12}O_6$)	180			
e		40,0	0,60	0,36
Arabinose ($C_5H_{10}O_5$)	150			
Xilose ($C_5H_{10}O_5$)	150	40,0	2,76	1,76
Polissacarídeos ($C_5H_8O_4$) _n	132	45,4	3,63	3,40
Oligossacarídeos ($C_6H_{10}O_5$) _n	162	44,0	0,71	0,71
T O T A L			9,99	8,65

4.4.1.1 - Resistência ao furfural

Através de um ensaio preliminar verificou-se a resistência dos fungos *A. niger* IZ-9, *F. moniliiforme* IZ-1418, *F. moniliiforme* IZ-2007 e *F. oxysporum* IZ-2008, a níveis crescentes de furfural (Tabela 4).

Os fungos cresceram em placas de Petri, incubados por 72 horas a 30°C em estufa retilínea FANEM, utilizando-se como meio de cultivo o meio sólido de CHRISTIAS *et alii* (1975).

4.4.1.2 - Crescimento em meio líquido

Após a observação do crescimento dos fungos, anteriormente citados, em placas de Petri com meio sólido contendo doses crescentes de furfural, foi conduzido um ensaio, fazendo-se substituição do meio líquido de CHRISTIAS *et alii* (1975), tomado como padrão, pelo licor não tratado, para se verificar a produção de biomassa, seguindo-se o esquema de montagem da Tabela 5.

4.5 - Instalação dos Experimentos

4.5.1 - Local

O presente trabalho foi realizado no Departamento de Tecnologia Rural da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - USP - Piracicaba - São Paulo.

4.5.2 - Linhagem utilizada

Para a realização deste trabalho escolheu-se através de ensaios preliminares (4.4.1.) o fungo *Aspergillus niger*, que mostrou potencial favorável na síntese de biomassa protéica .

Tabela 4. Tratamentos usados no ensaio preliminar para verificar a resistência dos fungos *A. niger* IZ-9, *F. moniliiforme* IZ-1418 e IZ-2007 e *F. oxysporum* IZ-2008, a níveis crescentes de furfural.

Conc. de furfural (% - V/V)	Furfural (ml/placa)	Meio de CHRISTIAS et alii(1975)(m /placa)
0,0 ^{a/}	0,0	25
0,02	0,005	25
0,04	0,01	25
0,08	0,02	25
0,16	0,04	25
0,24	0,06	25
0,32	0,08	25

^{a/} Tratamento padrão sem adição de furfural.

Tabela 5. Substituição do meio líquido CHRISTIAS *et alii* (1975), usado como padrão, por concentrações crescentes do licor não tratado.

Concentração do Licor (%)	Volume do meio sin- tético (ml)	Volume do licor não Tratado (ml)	Furfural no licor não Tratado (mg)
0	62,5 ^{a/}	0,0	-
5	59,4	3,1	6,97
10	56,3	6,2	13,94
15	53,2	9,3	20,91
20	50,1	12,4	27,88
25	47,0	15,5	34,85
30	43,9	18,6	41,82
35	40,8	21,7	48,79
40	37,7	24,8	55,76
45	34,6	27,9	62,73
50	32,5	30,0	69,70
55	29,4	33,1	76,67
60	26,0	36,5	83,64

^{a/} 62,5 ml volume total.

4.5.3 - Meio de Cultivo

Usou-se o meio sintético de composição definida, original de PONTECORVO *et alii* (1953), modificado por CHRISTIAS *et alii* (1975), tendo a seguinte composição:

glicose	10 g
nitrato de sódio	06 g
fosfato dihidrogenado de potássio .	1,52 g
cloreto de potássio	0,52 g
sulfato de magnésio hepta-hidratado	0,52 g
peptona	2,0 g
extrato de levedura	1,0 g
ácido casaminado	3,0 g
ácido nucléico hidrolizado	0,5 g
água destilada	1.000 ml
ágar	20 g (quando sólido)
pH	5,0

Este meio foi usado para manutenção e estoque da linhagem, crescimento da cultura, e nos ensaios e experimentos de produção de biomassa.

A esterilização foi procedida em autoclave à temperatura de 121,5°C, por 15 minutos.

4.5.4 - Crescimento da Cultura e Padronização do Inóculo

O *A. niger* foi isolado de confídios aéreos e mantido

em estufa a 30°C por 6 a 8 dias, em ágar inclinado contendo meio completo para *Aspergillus* (CHRISTIAS *et alii*, 1975). Fez-se a transferência da cultura para placas de Petri e depois de 6 - 8 dias foram retirados discos de ágar com 5mm de diâmetro cortados da periferia da cultura jovem, para posterior inoculação (Figuras 1 e 2).

4.5.5 - Inoculação e incubação

O *A. niger* cresceu em meio líquido completo (usado como padrão), contido em frascos Erlenmeyers de 250 ml, com 62,5 ml de meio de acordo com os tratamentos usados. Os meios foram inoculados com 5 discos de ágar, cortados da periferia da cultura jovem (6-8 dias), e incubados por 72 horas a aproximadamente 30°C em Shaker oscilatório - ARTHUR H. THOMAS Co. PHILADELPHIA U.S.A. 115 volts COCY A. C.

4.5.6 - Filtração e peso da matéria seca do micélio

No final do período de incubação o meio líquido foi filtrado, com papel de Filtro Qualitativo FRAMA nº 1, em um kitasato com trompa a vácuo e um funil de sucção.

Em seguida os micélios foram pesados em Balança METTLER cap. 160 g. e depois conduzidos para secar em estufa PRECISION THELCO - MODEL 18 com circulação de ar, a uma temperatura de 100°C, por 24 horas.

Figura 1. Crescimento do *A. niger* em meio completo para *Aspergillus*, (CHRISTIAS *et alii*, 1975)

Figura 2. Padronização do inóculo através de discos de ágar com 5mm de diâmetro cortados da periferia da cultura jovem (6 - 8 dias).

4.5.7 - Delineamento Experimental e Análise Estatística

Foram conduzidos seis experimentos, nas mesmas condições experimentais, usando concentrações crescentes dos licores e tratamentos com diferentes condições nutricionais compreendendo o controle do teor de carbono, nutrientes e pH do meio.

As concentrações dos licores variaram de 0% (meio sintético puro) até 100% em substituição ao meio sintético.

As diferentes condições nutricionais usadas com as concentrações dos licores em substituição ao meio sintético encontram-se descritas, em detalhe, nas Tabelas 6, 7 e 8.

A análise de variância de todos os experimentos foi realizada segundo o delineamento inteiramente casualizado, com três repetições, sendo feita a comparação entre as médias de acordo com o teste de Tukey (GOMES, 1970).

Foram feitas também, as análises de variância entre os tratamentos (condições nutricionais) nas mesmas concentrações, com a finalidade de verificar qual a melhor concentração para cada condição nutricional.

4.5.8 - Análises Químicas

4.5.8.1 - Determinação de nitrogênio e proteína

O nitrogênio total foi determinado pelo método micro-Kjeldahl (BAILEY, 1967).

A proteína bruta do micélio foi estimada, multiplicando-se o teor de nitrogênio total pelo fator 6,25 (AOAC).

4.5.8.2 - Análise dos aminoácidos

Os aminoácidos foram determinados quantitativamente pela reação com nihidrina em analisador Beckman, modelo 120 C, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura.

Tabela 6. Substituição pura e simples do meio sintético, pelo licor tratado e licor não tratado (V/V).

Concentração de licor (%)	Volume do meio sintético (mℓ)	Volume dos licores Tratado e não Tra <u>ta</u> tado (mℓ)
0	62,5	0,0
10	56,3	6,2
20	50,0	12,5
30	43,8	18,7
40	37,5	25,0
50	31,3	31,2
60	25,0	37,5
70	18,7	43,8
80	12,5	50,0
90	6,3	56,2
100	0,0	62,5

Tabela 7. Substituição pura e simples do meio sintético pelo licor tratado (V/V), mantendo constante o teor dos nutrientes, em função do existente no meio sintético.

Concentração do licor (%)	Volume dos nu- trientes dissol- vidos em H ₂ O (ml)	Volume de licor tratado (ml)	Volume de H ₂ O (ml)
0	6,25	0,00	56,25
10	6,25	6,25	50,00
20	6,25	12,50	43,75
30	6,25	18,75	37,50
40	6,25	25,00	31,25
50	6,25	31,25	25,00
60	6,25	37,50	18,75
70	6,25	43,75	12,50
80	6,25	50,00	6,25
90	6,25	56,25	0,00
100	0,00	62,50	0,00

Tabela 8. Substituição do meio sintético pelo licor tratado e não tratado (V/V), usados como fonte de carbono com níveis constantes e crescentes, sem alterar os teores de nutrientes, com e sem ajuste de pH.^{a/}

Concentração ^{b/} de Licor (%)	C-total (mg)	C-glicose (mg)	C-açúcares do licor (mg)	Volume do licor (mℓ)
0	250	250,00	-	-
5	250	218,75	31,25	3,12
10	250	187,50	62,50	6,25
15	250	156,25	93,75	9,37
20	250	125,00	125,00	12,50
25	250	93,75	156,25	15,60
30	250	62,50	187,50	18,75
35	250	31,25	218,75	21,90
40	250	-	250,00	25,00
60	375	-	375,00	37,50
80	500	-	500,00	50,00
100	625	-	625,00	62,50

a/ - O pH foi ajustado para 5,0 com NaOH 0,01N

b/ - As grandezas indicam quantidades por volume total(62,5mℓ)

c/ - Os nutrientes e glicose foram adicionados por dissolução em água destilada, usada para completar o volume 62,5mℓ. No tratamento T₁₀₀, a dissolução foi feita no volume da solução do licor.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Ensaio Preliminares

Verificou-se que os fungos *Aspergillus niger* IZ-9 (NRRL) e *Fusarium oxysporum* IZ-2008 (UR) foram os que apresentaram maior resistência a concentrações crescentes de furfural em meio sintético (Tabela 9). *Fusarium oxysporum* apresentou resistência até o nível de 0,16% de furfural e *Aspergillus niger* até 0,04%. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por STAKHORSKAYA (1968) e PETROVIC (1969) realizando experimentações com leveduras com faixa de variação de resistência ao furfural de 0,04% a 0,2% em meio sintético.

No ensaio para produção de biomassa usando como tratamentos a substituição pura e simples do meio padrão por concentrações crescentes do licor, *A. niger* foi mais eficiente, tendo produzido massa micelial com percentagem de substituição do meio sintético pelo licor até 45%, enquanto *F. oxysporum* e *F. moniliiforme* IZ-1418 cresceram até o nível de 15% e *F. moniliiforme* IZ-2007 com apenas 10% (Tabela 10).

Tabela 9. Resultado do ensaio para seleção de microrganismo, através da esporulação,^{a/} em função de níveis crescentes de furfural.

Microrganismos	Concentração de Furfural (%)				
	0	0,02	0,04	0,08	0,16
<i>A. niger</i> IZ-9 (NRRL)	+++++	++++	+++		
<i>F. moniliiforme</i> IZ-1418(NRRL)	+++++	++++	++		
<i>F. moniliiforme</i> IZ-2007(UR)	+++++	++++	+		
<i>F. oxysporum</i> IZ-2008(UR)	+++++	++++	+++	++	+

a/ esporulação: excelente = +++++

bom = ++++

regular = +++

fraco = ++

pobre = +

Tabela 10 - Resultado do ensaio para seleção de microrganismo produtor de biomassa, utilizando como substrato o licor residual da pré-hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar em substituição ao meio sintético.

Concentração de Licor (%)	Biomassa (g/62,5 mL)			
	<i>A.niger</i> IZ-9	<i>F.oxysporum</i> IZ-2008	<i>F.moniliiforme</i> IZ-1418 IZ-2007	
0	0,34	0,20	0,30	0,32
5	0,36	0,11	0,32	0,37
10	0,37	0,13	0,30	0,03
15	0,35	0,24	0,19	0
20	0,37	0	0	0
25	0,42	0	0	0
30	0,43	0	0	0
35	0,47	0	0	0
40	0,48	0	0	0
45	0,08	0	0	0
50	0	0	0	0
55	0	0	0	0
60	0	0	0	0

Estes resultados foram concordantes com os obtidos por CAMARGO (1975) em ensaios preliminares com o licor em estudo. Usando três fungos filamentosos e duas leveduras foi encontrado que *A. niger* mostrou melhores resultados para produção de massa microbiana.

Com base nestes resultados *A. niger* IZ-9 (NRRL) foi selecionado como microrganismo para estudar a viabilidade do uso do licor obtido da pré-hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar para produção de biomassa protéica.

5.2 - Experimentos com o Licor

5.2.1. Produção de massa micelial

Os resultados da produção de massa micelial de *A. niger* desenvolvendo-se em concentrações crescentes de licor substituindo o meio sintético, nos experimentos com diferentes condições nutricionais, aqui consideradas como tratamentos, estão sumarizados nas Tabelas 11 e 12. As Figuras 3, 4 e 5 mostram comparações entre tratamentos com licor tratado e não tratado. Na Figura 6 observa-se correlação positiva altamente significativa ($r = 0,99$) da massa micelial em função do teor de carbono no licor tratado.

Os resultados parciais (teste F) das análises de variância dos experimentos com concentrações crescentes do licor substituindo o meio sintético e entre os tratamentos com diferentes condições nutricionais são apresentados nas Tabelas 13 e 14.

Tabela 11 - Produção de massa micelial (g/62,5 ml), por *Aspergillus niger*, em função das concentrações de licor tratado e não tratado dentro de cada tratamento do licor ^{a/} (médias de 3 repetições)

Concentração de Licor {%}	Licor Tratado				Licor não Tratado	
	SS exp.1	Nutr. exp.2	C e Nutr. exp. 3	C,Nutr. e pH exp.4	SS exp.5	C,Nutr. e pH exp.6
0	0,34 ^d	0,39 ^e	0,34 ^{bc}	0,30 ^f	0,34 ^d	0,34 ^b
10	0,39 ^{cd}	0,44 ^{cd}	0,32 ^{bc}	0,29 ^f	0,37 ^c	0,32 ^b
20	0,48 ^b	0,53 ^c	0,30 ^c	0,34 ^{ef}	0,37 ^c	0,38 ^b
30	0,50 ^{ab}	0,55 ^c	0,35 ^{bc}	0,39 ^{de}	0,43 ^b	0,45 ^a
40	0,56 ^a	0,59 ^{bc}	0,40 ^b	0,45 ^d	0,48 ^a	0,48 ^a
60	0,45 ^{bc}	0,71 ^a	0,56 ^a	0,61 ^c	θ e	0,46 ^a
80	0,33 ^d	0,68 ^{ab}	0,61 ^a	0,72 ^b	θ e	θ c
100	e	0,44 ^{cd}	b/	0,85 ^a	θ e	θ c
C.V.(%)	6,40	5,84	8,76	6,91	4,03	7,34

a/ - Tratamentos de acordo com as Tabelas 6, 7 e 8, sendo:

SS = substituição pura e simples do meio sintético pelo licor;
 C = nível de carbono;
 Nutr. = balanceamento dos níveis de nutrientes, de acordo com o existente no meio sintético; e
 pH = ajuste de pH para 5,0.

b/ - Não foi usado o tratamento com 100% de licor.

Tabela 12. Produção de massa micelial (g/62,5 ml), por *A. niger*, em função dos tratamentos do licor ^{a/}, usando comparações em cada concentração do licor (média de 3 repetições).

Tratamento do Licor	Concentração do Licor (%)							
	0	10	20	30	40	60	80	100
<u>Licor Tratado</u>								
SS	0,34	0,39	0,48	0,50	0,56	0,45	0,33	0
Nutr.	0,39	0,44	0,53	0,55	0,59	0,71	0,68	0,44
C e Nutr.	0,34	0,32	0,30	0,35	0,40	0,56	0,61	b/
C, Nutr. e pH	0,30	0,29	0,34	0,39	0,45	0,61	0,72	0,85
<u>Licor não Tratado</u>								
SS	0,34	0,37	0,37	0,43	0,48	0	0	0
C, Nutr. e pH	0,34	0,32	0,38	0,45	0,48	0,46	0	0
C.V.(%)	1,36	1,76	2,01	2,58	1,64	0,45	0,48	1,80

a/ - Tratamentos de acordo com as Tabelas 6, 7 e 8, sendo:

SS = substituição pura e simples do meio sintético pelo licor;

C = nível de carbono;

Nutr. = balanceamento dos níveis de nutrientes, de acordo com o existente no meio sintético; e

pH = ajuste de pH para 5,0.

b/ - Não foi usado o tratamento com 100% de licor.

Pelos resultados da Tabela 11 a produção de massa micelial variou com a adição das quantidades crescentes de licor em substituição ao meio sintético. Esta variação, de uma maneira geral, foi mais notante com o licor tratado, havendo produções mais elevadas de massa micelial, o que está de acordo com o esperado, tendo em vista que pela evaporação foram eliminados compostos voláteis, possíveis interferentes para o crescimento de microrganismos. Constatou-se que quando usou-se o licor tratado o crescimento de *A. niger* se verificou até o limite máximo de substituição do meio sintético pelo licor (100%) nos tratamentos com balanceamento de nutrientes, e com balanceamento de nutrientes, carbono e ajuste de pH.

A massa micelial produzida por *A. niger* crescendo no meio sintético (padrão) mostrou variação não significativa, demonstrando assim que o controle das condições ambientais foi satisfatório (Tabela 12).

Verificou-se pela Figura 3, que a produção de massa micelial de *A. niger* usando o licor tratado e não tratado em substituição pura e simples ao meio sintético mostrou diferença bastante acentuada. O licor tratado possibilitou o crescimento do fungo até o nível de substituição de 90%, enquanto no licor não tratado o crescimento foi inibido a partir do nível de 45% de substituição. É interessante observar que a produção máxima de biomassa foi obtida com o licor tratado e não tratado na concentração de 40% em substituição ao meio sintético.

Na Tabela 2 encontram-se os resultados da análise quantitativa dos açúcares presentes no licor tratado. Trabalhos

Fig. 3. Crescimento de *A. niger* em função da adição de licor tratado e não tratado, em substituição pura e simples ao meio sintético.

realizados por STEINBERG (1939^{b/} e 1942) e AGNIHOTRI(1964) também mostraram que sacarose, glicose, frutose e maltose são excelentes fontes de carbono para o crescimento de *A. niger*.

De acordo com a Tabela 11, comparando o crescimento de *A. niger* usando o licor não tratado em substituição pura e sim ples com a substituição com balanceamento de nutrientes, carbono e ajuste do pH, verificou-se que não houve diferença quando conside radas as mesmas concentrações, significando que o inibidor conti nuou ativo prejudicando o crescimento do microrganismo.

Com o licor tratado os dados indicaram que o princi pal fator de crescimento em deficiência no licor diz respeito aos nutrientes, tendo em vista que *A. niger* desenvolveu massa miceli- al até a substituição total do meio sintético pelo licor (Figura 4). Por outro lado, é interessante observar na Figura 5, que o cresci mento máximo foi obtido na concentração 100% com o balanceamento dos nutrientes, carbono e ajuste do pH, indicando também a impor- tância do controle deste último fator.

O cálculo da equação de regressão entre o peso de matéria seca do micélio e o teor de carbono no meio por adição de quantidades crescentes do licor (Figura 6) permitiu avaliar o efe i to deste último na produção de biomassa, observando-se relação po- sitiva altamente significativa. Estes resultados permitem conclu- ir que o licor pode ser utilizado como excelente fonte de carbono para o crescimento de *A. niger*.

Pela análise de variância parcial (teste F) verificou-se que todos os experimentos (tratamentos com diferentes condições nutricionais do licor) mostraram diferença altamente significativa para a produção de massa micelial, de acordo com as concentrações crescentes do licor em substituição ao meio sintético (Tabela 13). A maior variação ocorreu no tratamento usando licor tratado com nutrientes e carbono balanceados e com ajuste do pH, onde se observou crescimento contínuo do micélio de *A. niger* até 100% de substituição (Tabela 11).

Pela Tabela 14, onde encontram-se os resultados parciais da análise de variância, comparando as concentrações dentro dos tratamentos, constatou-se diferenças altamente significativas para produção de massa micelial, com as variações máximas nas concentrações 80% e 100% de licor em substituição ao meio sintético.

Observou-se pelos dados dos coeficientes de variação apresentados na Tabela 14, que todos os experimentos mostraram boa precisão.

Fig. 4. Crescimento de *A. niger* em função da adição de licor tratado e não tratado em substituição ao meio sintético, comparado com a substituição com balanceamento de nutrientes.

Fig. 5. Crescimento de *A. niger*, em função da adição de licor com e sem ajuste do pH, mantido constante o teor de nutrientes.

Fig. 6. Curva de regressão entre o teor de carbono do licor e o peso da massa micelial de *A. niger*, crescendo em concentrações crescentes do licor.

Tabela 13. Resultados parciais da análise de variância do peso da massa micelial, percentagem de proteína e proteína total dos experimentos com diferentes condições nutricionais.^{a/}

Tratamento do Licor	Valor F		
	Matéria seca (g)	Proteína %	Proteína total (g/l)
Licor não tratado			
Substituição Simples	18,343**	106,656**	105,425 **
Licor não tratado			
Nutrientes, carbono e pH balanceados	22,740**	4,262*	29,123**
Licor tratado			
Substituição simples	33,452**	7,525*	20,279**
Licor tratado			
Nutrientes balanceados	30,829**	43,853**	19,689**
Licor tratado			
Nutrientes e carbono balanceados	8,243*	0,216 ^{n.s.}	4,815*
Licor tratado			
Nutrientes, carbono e pH balanceados	45,684**	4,469*	35,213**

a/ Nas análises só foram consideradas as parcelas onde houve desenvolvimento de *A. niger*.

Tabela 14. Resultados parciais da análise de variância do peso da massa micelial, percentagem de proteína e proteína total, comparando os tratamentos do licor dentro de cada concentração.^{a/}

Concentração de Licor (%)	Valor F		
	Matéria seca (g)	Proteína (%)	Proteína total (g/l)
10	2,695	1,524	5,318*
20	4,212	20,719**	6,272*
30	2,143	19,563**	2,890
40	23,901**	11,185**	3,152
60	13,225**	4,318*	1,347
80	32,536**	30,384**	22,353**
100	227,804**	159,625**	125,618**

a/ Nas análises só foram consideradas as parcelas onde houve desenvolvimento de *A. niger*.

No licor tratado com nutrientes balanceados observou-se resultados superiores aos encontrados com o mesmo licor com nutrientes, carbono e pH ajustado, com exceção do tratamento com 100% de licor que apresentou 29,7% de proteína e massa micelial máxima (0,85g/62,5ml) como se verificou na Tabela 11. Este resultado permitiu admitir que o ajuste de pH teve influência na produção de massa micelial, o que está em desacordo com os dados obtidos por AGNIHOTRI (1964) que não observou efeito do pH na produção de massa micelial usando várias espécies de *Aspergillus*. Por outro lado, MOHYUDDIN *et alii* (1976) encontraram correlação negativa entre a biomassa produzida por *Aspergillus flavus* e o teor protéico da massa micelial o que está concordando com os resultados obtidos, para a concentração 100% de licor. Vale considerar, entretanto, que no presente trabalho, de maneira geral, não observou-se correlação entre estes dois parâmetros.

Pelos resultados parciais da análise de variância com relação a percentagem de proteína (Tabelas 13 e 14) pode-se constatar que todos os experimentos tiveram boa precisão, a julgar pelos baixos valores dos coeficientes de variação.

Pelo exame da Tabela 13 verificou-se que os valores obtidos para o teste F foram altamente significativos, para o teor e produção de proteínas, principalmente nas concentrações mais elevadas de licor em substituição ao meio sintético.

5.2.2. Produção de Proteína

Verificou-se que *A. niger* desenvolvido em licor re-

sidual do bagaço de cana-de-açúcar produziu, após 72 horas de incubação a 30°C, uma massa micelial com 29,7% de proteína (Tabela 15), correspondendo a 4,06g/l de proteína (Tabela 16), quando utilizou o meio com 100% de licor tratado com balanceamento de nutrientes, carbono e ajuste do pH. Estes resultados foram superiores ao obtido por MENEZES *et alii* (1976) trabalhando com *Myrothecium verrucaria* crescendo em bagaço de cana submetido apenas a moagem e peneiragem, cujos valores foram respectivamente 7,7% de proteína que correspondeu a 0,30g/l de proteína. Estes autores encontraram o dobro destes valores quando o bagaço de cana foi tratado com NaOH a 4% durante 10 minutos e a 120°C. Estes rendimentos foram considerados baixos, admitindo-se como causa provável que o tratamento térmico tenha sido insuficiente ou que outras condições não tenham sido totalmente otimizadas.

As variações da concentração do licor tratado e não tratado influenciaram em relação a produção de proteína total(g/l) nos diversos tratamentos, sendo estes resultados de uma maneira geral, sempre crescentes, como pode-se observar na Tabela 16.

Comparando-se os dois tipos de licores usados, pode-se verificar que a melhor produção foi obtida com o licor tratado substituindo integralmente o meio sintético, com carbono, nutrientes balanceados e ajuste do pH, produzindo 4,06g/l, enquanto que o licor não tratado apresentou 3,9g/l, na concentração de 60% de licor substituindo o meio sintético.

Tabela 15. Percentagem de proteína produzida por *A. niger*, usando concentrações crescentes de licor tratado e não tratado, em função dos tratamentos do licor (média de 3 repetições).

Concentração do Licor (%)	Licor Tratado				Licor não Tratado	
	S.S.	Nutr. C e	Nutr. C.Nutr. e pH		S.S.	C.Nutr. e pH
0 ^{a/}	31,27ab	31,27d	31,27 c	31,27bc	31,27 c	31,27bc
10	36,19a	37,79b	35,40abc	33,42ab	33,07 c	30,96bc
20	35,62a	36,81b	34,38bc	33,35bc	38,48b	31,39bc
30	29,31b	36,63b	37,92a	33,41b	38,04b	32,50abc
40	29,44b	36,48b	35,79abc	36,20a	45,23a	35,85ab
60	31,79ab	34,19c	37,21ab	32,24bc	0 d	37,21a
80	33,33ab	33,79c	35,86abc	29,63c	0 d	0 d
100	0 c	44,13a	b/	29,69c	0 d	0 d
C.V.(%)	3,90	1,06	3,10	1,73	2,10	3,96

a/ padrão - média de 6 repetições, representadas por uma amostra de cada experimento.

b/ não foi usado o tratamento na concentração 100% de licor.

Tabela 16. Produção de proteína total (g/l), por *Aspergillus niger*, em função das concentrações de licor tratado e não tratado e dos tratamentos do licor (média de 3 repetições).

Concentração do Licor (%)	Licor Tratado				Licor não Tratado	
	S.S.	Nutr.	C e Nutr.	C, Nutr. e pH	S.S.	C, Nutr. e pH
0	1,82 ^{cd}	1,94 ^e	1,74 ^c	1,55 ^e	1,74 ^e	1,71 ^c
10	2,24 ^{bc}	2,64 ^{cd}	1,68 ^c	1,52 ^e	1,94 ^d	2,20 ^c
20	2,78 ^a	3,10 ^{cd}	1,67 ^c	1,83 ^e	2,30 ^c	2,68 ^{bc}
30	2,34 ^b	3,24 ^{bc}	2,21 ^{bc}	2,34 ^{de}	2,60 ^b	3,39 ^{ab}
40	2,66 ^{ab}	3,46 ^{abc}	2,28 ^{bc}	2,59 ^{cd}	3,47 ^a	3,92 ^a
60	2,27 ^b	3,88 ^a	2,72 ^b	3,13 ^{bc}	θ ^f	3,90 ^a
80	1,76 ^d	3,66 ^{ab}	3,53 ^a	3,57 ^{ab}	θ ^f	θ ^d
100	0 ^e	3,08 ^{cd}	a/	4,06 ^a	θ ^f	θ ^d
C.V.(%)	7,57	6,24	13,53	7,63	5,02	12,45

a/ não foi usado o tratamento na concentração 100%.

5.2.3. Análise dos aminoácidos

Examinando-se o perfil de aminoácidos da proteína de *A. niger* (Tabela 17) desenvolvido em licor residual da pré-hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar, e comparando com as exigências em aminoácidos essenciais para o homem, verificou-se que os mais limitantes são os aminoácidos sulfurados como a metionina e a meia cistina. O perfil de aminoácidos do *A. niger* foi superior a outras espécies fúngicas utilizadas para a produção de biomassa, como o *Myrothecium verrucaria* crescido em bagaço de cana-de-açúcar (MENEZES *et alii*, 1976), exceção feita aos aminoácidos metionina, meia cistina e treonina.

Observou-se que os resultados da análise dos aminoácidos de *A. niger* crescido em 40% de licor tratado com carbono, nutrientes e pH balanceados foram os que apresentaram teores mais altos em todos os 16 aminoácidos analisados, com exceção da alanina e glicina, que foram inferiores ao encontrado para *A. niger* crescido no meio padrão.

Pela Tabela 18 comparou-se os aminoácidos essenciais encontrados no micélio de *A. niger* crescido no licor, com o de outros microrganismos usados para produção de biomassa protéica, e também com os aminoácidos do ovo e o necessário para o desenvolvimento normal de crianças (FAO). Verificou-se que, com exceção da metionina, a proteína do micélio de *A. niger* pode ser tomada como de boa qualidade e possivelmente usada em dieta infantil, após os testes prévios de eficiência protéica.

Tabela 17. Composição de aminoácidos (g/100 g proteína) no micélio de *A. niger* crescido em meios com quantidades crescentes de licor e diferentes teores de carbono total, com nutrientes e pH ajustados.

Aminoácido	Quantidade de Licor				Padrão
	Tratado			Não Tratado	
	(100%)	(40%)	(30%)	(40%)	
Lisina	2,58	6,52	5,37	4,95	4,08
Histidina	1,50	2,65	2,16	1,85	1,50
Arginina	3,87	6,88	5,70	5,01	3,87
A. aspártico	7,33	11,23	8,98	10,31	8,15
Treonina	3,10	5,14	4,31	4,68	3,87
Serina	2,79	4,18	3,53	3,89	3,62
A. Glutâmico	11,46	18,90	13,78	15,87	17,39
Prolina	4,56	6,18	4,91	4,82	5,28
Glicina	6,92	7,42	7,82	7,48	7,59
Alanina	5,34	8,63	7,02	7,51	9,13
1/2 Cistina	-	-	-	-	-
Valina	4,81	7,59	6,20	7,20	6,00
Metionina	0,17	0,34	0,17	0,21	-
Isoleucina	3,55	5,33	4,40	5,00	4,03
Leucina	5,80	9,17	7,46	8,40	7,10
Tirosina	1,09	4,07	2,53	2,84	1,19
Fenilalanina	3,44	5,73	4,70	5,26	2,54

Tabela 18. Comparação dos aminoácidos essenciais em *A. niger*, *Candida utilis*, *Bacillus sp*, ovo e exigências necessárias para crianças.

Aminoácidos essenciais	g/100g de proteína				Exigências de crianças e/
	a/ <i>C.utilis</i>	b/ <i>Bacillus</i>	c/ <i>A.niger</i>	d/ ovo	
Isoleucina	7,9	6,1	5,3	6,8	5,7
Leucina	7,5	8,9	9,2	9,0	6,8
Lisina	8,7	6,9	6,5	6,3	4,7
Metionina	1,8	2,7	0,3	3,1	2,0
Fenilalanina	5,1	5,6	5,7	6,0	4,1
Treonina	5,5	4,3	5,1	5,0	4,0
Triptofano	1,4	n.d.	n.d.	1,7	1,0
Valina	6,3	6,7	7,6	7,4	4,8

a/ Segundo INSKEEP *et alii* (1951).

b/ Segundo MATELES *et alii* (1967).

c/ *A.niger* crescido em meio contendo 40% de licor tratado com carbono, nutrientes e pH ajustado.

d/ BURTON (1966) considerado padrão pela FAO.

e/ Exigências consideradas pela FAO, segundo HEGSTED (1969).

n.d. = não determinado

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos nestes experimentos permitem inferir as seguintes conclusões:

1. *A. niger* pode ser usado para produzir biomassa protéica utilizando como substrato o licor residual da pré-hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar, tendo em vista que este licor contém açúcares fermentáveis que permitem sua utilização como fonte de carbono;
2. A produção de massa micelial variou com a adição de licor em substituição ao meio sintético, com influência mais notante quando usou-se o licor após o tratamento térmico (licor tratado);
3. A produção máxima de biomassa protéica por *A. niger* foi obtida quando usou-se 100% de licor tratado em substituição ao meio sintético, na condição nutricional com balanceamento de carbono e nutrientes e pH ajustado para 5,0;

4. A produção de proteína total de uma maneira geral aumentou com a adição de quantidades crescentes do licor em substituição ao meio sintético;
5. A maior produção de proteína total foi obtida quando usou-se o licor tratado na concentração 100%, com carbono e nutrientes balanceados e pH ajustado para 5,0;
6. Os aminoácidos sulfurados metionina e meia cistina presentes na massa micelial produzida por *A. niger* crescendo no licor foram os mais limitantes comparando com as exigências de aminoácidos essenciais para o homem;
7. *A. niger* crescendo em meio com 40% do licor tratado, com carbono e nutrientes balanceados e pH ajustado para 5,0 apresentou os teores mais altos em aminoácidos;
8. Comparando o perfil da aminoácidos de *A. niger* crescido em licor, com os aminoácidos do ovo e o necessário para o desenvolvimento normal de crianças, verificou-se que, com exceção da metionina, a proteína do micélio pode ser considerada como de boa qualidade;
9. Finalmente, os resultados obtidos sugerem a realização de pesquisas visando verificar quais os nutrientes realmente limitantes para o crescimento de *A. niger* crescendo no licor, e a aplicação dos testes de eficiência protéica que poderão possibilitar a prática do uso desta biomassa protéica em dieta infantil.

7. SUMMARY

Experiments were carried out in order to study total or partial utilization of pre-hydrolysed residual liquor of sugar-cane bagasse as raw material for the production of monocellular protein. Increasing concentrations of treated and non-treated liquor replacing the synthetic media, and different liquor nutritional conditions were utilized. Based on preliminary trials, the fungus *Aspergillus niger* Van Tieghen catalogued under no. IZ-9 in the type collection of the Instituto Zimotécnico of ESALQ-USP was selected and utilized as the test microorganism.

All experiments were carried out using a completely randomized experimental design, with 3 replications. The weight of the mycellium dry matter, total protein production and quantitative aminoacid analyses were determined.

Results of the test showed that there was a highly significant difference between increasing liquor concentrations and also between the different nutritional conditions studied.

The best results were obtained with a 40% concentration

level for both treated and non-treated liquor, under conditions of a simple replacement. Highest biomass production was obtained when liquor treated with carbon and balanced nutrients and pH adjusted at 5.0 was utilized.

Considering a simple replacement of the synthetic media by liquor the treated liquor enabled production of mycellial mass by *A. niger* to the level of 90%, while the non-treated liquor inhibited mould growth starting from the 45% level of replacement.

Results of the experiments with different nutritional conditions showed that nutrients were the main limiting factor of *A. niger* growth, with indication of some influence of pH.

A highly significant correlation was shown between the carbon content of the liquor and bio-mass production, suggesting that the liquor can be used as a source of carbon for *A. niger* growth.

The effect of concentration of treated and non-treated liquor in the production of total protein was also verified. Results showed an increase with increasing liquor concentration. Finally, the effect of liquor concentration on protein quality was assessed by analyzing the aminoacids, utilizing treated liquor with balanced carbon and nutrients and pH adjusted 5.0, the highest content of aminoacids was obtained at a 40% replacement level.

8. LITERATURA CITADA

AGNIHOTRI, V.P. 1964. Studies on *Aspergilli* Effect of pH, Temperature and Carbon and Nitrogen Interaction. *Mycopath. Mycol. Appl.* 24:305-314.

AGRAWAL, G.D. 1974. Possible Utilization of Sugar Cane Bagasse. *Indian J. Environ. Health.* 16(2): 159-167. *Biological Abst.* 60: (65716). 1975.

AMORIM, H.V. 1976. Extração, Identificação e Quantificação de Carboidratos In: Práticas de Bioquímica dos Compostos Naturais de Plantas. Depto. Química, ESALQ, USP (mimeografado).

ARAUJO NETO, J.S. e A.D.PANEK. 1973. Growth of *Candida utilis* on Cellulosic Wastes (extracts of banana leaves). *Global Impact of Applied Microbiology, IVth International Conference. Abstracts*, p. 24.

BAILEY, J.L. 1967. Determination of Nitrogen. In: BAILEY, J. L. Techniques in Protein Chemistry. 2nd ed. Amsterdam, Elsevier. p. 346 - 7.

BALANKURA, B., STEWART, F.D., SCALF, R.E., e SMITH, L.A., 1946. Submerged Culture of Molds for Amylase Production. *J. Bact.* 51: 594.

BHATTACHARJEE, J.K., 1970. Microorganisms as Potential Sources of Foods. *Advances in Appl. Microbiology*, 13: 139-159.

BLOCK, S.S., STEARNS, T.W., STEPHENS, R.L. e Mc CANDLESS, R.F.J. 1953. Mushroom Mycelium, Experiments with Submerged Culture. *J. Agric. Fd. Chem.* 1: 890-893.

BURTON, B.T. 1966. Requerimentos de Nutrition en el Ser Humano In: BURTON. Nutricion Humana. 2a. ed. Washington D.C., *Organization Pan-Americana de la salud*, cap. 3, p. 149-162.

CALLIHAN, C.D. e DUNLAP, C.E. 1969. The Economics of Microbial Proteins Produced from Cellulosic Wastes. *Compost* 10: 6

CAMARGO, R. 1975. Ensaio Preliminares Visando o Aproveitamento do Licor Residual (hidrolisado a 10%) Referente ao Projeto "Bagaço de Cana como Matéria-Prima para a Produção de Celulose, Raion e Proteínas". *Relatório BNDE*, 6 p. (mimeografado).

- CAMARGO, R. 1978. Substratos para a Produção de Biomassa Protéica. "XXIV Congresso Brasileiro de Genética" - São Paulo. 9-15 julho, 13 p. (mimeografado).
- CHAMPAGNAT, A., C. VERNET, B. LAINE e J. FILOSA. 1963. Biosynthesis of Protein - Vitamin Concentrates from Petroleum. *Nature* (London). 197: 13-14.
- CHRISTIAS, C., COUVARAKI, S.G. GEORGOPOULOS, MACRIS, B. e VOMVOYANNI, V. 1975. Protein Content and Amino Acid Composition of Certain Fungi Evaluated for Microbial Protein Production. *Appl. Microbiology*. 29(2): 250-254.
- CLUTTERBUCK, P.W., R. LOVELL e H. RAISTRICH (1932). Biochemistry Journal (London. 26: 1907-1918. In: THATCHER, F.S. (1954) Foods and Feeds from Fungi. *Annual Review of Microbiology*, 8: 449-472.
- CODISTIL, 1976. "Contribuição ao Estudo da Unidade-Padrão de Destilarias Autônomas de Alcool Carburante Partindo de Cana-de-Açúcar e Possibilidade para o Bagaço Disponível". *Construtora de Destilarias Dedini S.A.* 29 p.
- DA GLORIA, N.A. e SANTA ANA, A.G. 1975. Métodos de Análises de resíduos de Usinas de Açúcar e Destilarias. *Revista de Agricultura*. Vol. 2 (1-2): 30-44.

EDOZIEN, J.C., U.U. UDO, U.R. YOUNG e N.S. SCRIMSHAW. 1970. Effects of High Levels of Yeast Feeding on Uric Acid Metabolims of Young Men. *Nature* (London), 228:180.

ENDO, A., 1962. Production of Pectic enzymes. *Hakko Kyokaishi*, 20: 282-287.

FALANGHE, H. 1962. Production of Mushroom Mycelium as a Protein and Fat Source in Submerged Culture in Medium of Vinasse. *Appl. Microbiology*. 10: 572-576.

FALANGHE, H., SMITH, A.K. e RACKIS, J.J. 1964. Production of Fungal Mycelial Protein in Submerged Culture of Soybean Whey. *Appl. Microbiology*. 12: 330-4.

FAO/WHO. 1973. Energy and Protein Requirement. Food and Agriculture Organization of United Nations. *Food Nutrition Meeting Report* Series No. 52, Rome.

FISCHGOLD, S., ANTON, I. e HERSEN, O. 1964. Obtaining of Sulfate Pulp for Chemical Processing from Beechwood. Prehydrolysis with Water. *Celuloza Hirtie*. 13 (11): 10-16. *Wood Products*. 51 (3294e) 1964.

GOMES, P., 1970. Curso de Estatística Experimental. *Gráfica Benetti Ltda.*, São Paulo. 430 pp.

GRAY, W.D., OCH, F.F. e SEOUD, M.A. 1964. Fungi Imperfecti as a Potencial Source of Edible Protein. *Develop. Ind. Microbiology*. 5: 384-389.

GUSANOVA, L.A. 1970. Effect of Furfural on the Biosynthesis of Protein and Nucleic Acids by Yeast (*Candida tropicalis*). *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 6 (5): 509-515. *Chemical Abst.* 74: {11869 u} 1971.

HAN, Y.W., DUNLAP, C.E. e CALLIHAN, C.D. 1970. Single Cell Protein from Cellulosic Wastes. *Fd. Technol.* 25: 130.

HAN, Y.W., DUNLAP, C.E. e CALLIHAN, C.D. 1971. Single Cell Protein from Cellulosic Wastes. *Fd. Technol.* 25: 130-33.

HAN, Y.D., SPLITTSTOESSER, D.F. e WOODAMS, E.E. 1975. Utilization of Brewery Spent Grain Liquor by *Aspergillus niger*. *Appl. Microbiology*. 30 (5): 879-880.

HANNEBERG, W. 1962. Handbuck der Gurungsbakteriologie. Paul Parey, Ltda. Berlin, 602 p.p. In: Lin Egren, C.C. 1949 The Yeast Cell, its Genetics and Cytology. Ed. Pub. Inc., Saint Louis. 296 pp.

HARRIS, E.E. e M.J. JOHNSON. 1948. Paper Industry & Paper World. 30: 30-35. In: THATCHER, F.S. 1954. Foods and Feeds from Fungi. *Annual Review of Microbiology*, 8: 449-472.

HEDEN, C.G., e N.MOLIN. 1971. The Productivity of Microorganisms
a Catalytic Factor for Research and Transdisciplinary Cooperation.
Symposia of the Society of General Microbiology, 21: 1-14.

HEGSTED, D.M. 1969. Protein Requirements. In: MUNRO, H.N. e ALLISON,
J.B. Mamalian Protein Metabolism. New York Academic Press.
Cap. 14, p. 62.

HEINES, V. e F.F.NORD. 1946. Arch. Bioch. 11: 521-530. In: THATCHER,
F.S. 1954 - Foods and Feeds from Fungi. *Annual Review of
Microbiology*, 8: 449-472.

HOOGERHEIDE, J.C. 1969. Horizons in Industrial Application of
Yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek J. Microbiology and Serology*,
35 (Suppl.): 71-82.

INSKEEP, G.C., WILEY, A.J., HOLDERBY, J.M. e HUGHES, L.P. 1951.
Foods Yeast from Sulfite Liquor. *Ind. Eng. Chem.* 43: 1702-1711.

JAMES, A.P., M.M. MAC NUTT e P.M.MORSE. 1965. The Influence of
Dose on the Spectrum of Radiation - Induced Mutants Affecting
a Quantitative Character in Yeast. *Genetics*, 52: 21-29.

JOHNSON, M.S. 1967. Growth of Microbial Cells on Hydrocarbons.
Science, 155: 1515-1519.

JOKL, L. e J.E.D. OLIVEIRA. 1973. Nutritive Value of Food Supplements
Produced with *Saccharomyces Cerevisiae* in Corn Media. *Global
Impacts of Applied Microbiology, IVth International Conference
Abstracts*. p. 24.

- KIHLBERG, R. 1972. The Microbe as a Source of Food. *Annual Review of Microbiology*, 26: 427-466.
- KIN, Z. 1965. Furfural by Product of Pulp Industry. *Przegląd Papier.* 21 (5): 157-161.
- KLIS, T.B. 1963. Real Mushroom in Powder Form. *Fd. Process.* 25: 99.
- LHOAS, P., 1961. Mitotic Haploidization by Treatment of *Aspergillus niger* Diploids with Para-fluorphenylamine. *Nature*, 190: 744.
- LHOAS, P., 1967. Genetic Analysis by Means of the Parasexual Cycle in *A. niger*. *Genet. Res. Camb.* 10: 45-51.
- LHOAS, P. 1968. Growth Rate and Haploidization of *A. niger* on Medium Containing Para-fluorphenylamine. *Genet. Res. Camb.* 12: 305-315.
- LOCKWOOD, L.B., 1975. Organic Acid Production In: SMITH, J.E. e D. R. BERRY, Eds. *The Filamentous Fungi*, Vol. I. Edward Arnold Ltd., London. pp. 140-157.
- MATELES, R.I., BARNAH, J.N. e TANNENBAUM, S.R. 1967. Growth of a Thermophilic Bacterium on Hydrocarbons: a New Source of Single Cell Protein. *Science*, 157: 1322-1323.
- MAUL, S.B., A.J.SINSKEY e S.R.TANNENBAUM. 1970. New Process for Reducing the Nucleic Acid Content of Yeast. *Nature*. (London). 228: 181.

MENEZES, T.J.B., OUCHINI, L.A. e FIGUEIREDO, I.B. 1976. Produção em Laboratório de Proteína Fúngica em Bagaço de Cana-de-Açúcar. *Rev. Bras. Tecnol.* 7 (4): 439-446.

MOHYUDDIN, M., SHARMA, T.R., KAUL, A.K. e NIEMANN, E.G. 1976. Use of *Aspergillus flavus* to Evaluate the Relative Nutritive Value in Cultivars of Rye, Wheat and Triticale. *J. Sci. Fd. Agric.* 27: 951-952.

MOR, J.R. e A.FIECHTER, 1968. Continuous Cultivation of *Saccharomyces cerevisiae*. I- Growth on Ethanol Under Steady-State Conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 10: 159-176.

MORRIS, G.G., K.C.PHILLIPS e F.K.E.IMRIE. 1973. The Production of Animal Feedstuffs by the Submerged Culture of Fungi on Agricultural Wastes. *Global Impacts of Appl. Microbiology, IVth International Conference. Abstracts*, p. 20.

NAWAWY, A.S. e M.A. FOUUDA. 1973. Comparative Study on SCP Production from Molasses, Vinasse, or Bakers Yeast Effluent. *Global Impacts of Appl. Microbiology, IVth International Conference Abstracts*. p. 26.

PARK, Y.K., PAPINI, R.S., WERNER, H.B. e VITTI, P., 1971. Produção de Amilase Fúngica por Fermentação Submersa, por Cultura em Semi-Sólido e Seu Uso em Panificação. *Rev. Bras. Tecnol.* 2: 181-185.

- PERLMAN, D. e C.J.SIH, 1960. Fungal Synthesis of Citric, Fumaric and Itaconic Acids. *Progress in Industrial Microbiology*, 2: 168-194.
- PETROVIC, S. 1969. Influence of Furfural on the Assimilation Rate of Sugars and on the Yeast Activity in Synthetic and Hidrolyzed Media. *Chemical Abst.* 1970. 72: 11376q.
- PONTECORVO, G. 1952. Non-random Distribution of Multiple Mitotic Crossing-over Among Nuclei of Heterozygous Diploid *Aspergillus*. *Nature*, 170: 204-205.
- PONTECORVO, G., J.A. ROPER e E.FORBES, 1953. Genetic Recombination Without Sexual Reproduction in *Aspergillus niger*. *J. General Microbiology*, 8: 198-210.
- POOL, E.L. e UNDERKOFER, L.A., 1953. Amylolytic Factors of bran Culture and Submerged Culture. *J. Agr. Fd. Chem.* 1: 87-90.
- QUEIROZ, A.P.; PIMENTEL, L.S.; LEME, A.M.P., MUENCH, A.FUKUARA, K.; BASTLEN, B.H.; SANTOS, N.R.M.; FERNANDES, O.L. e D'ANGELO, R.J.P. 1967. Resíduos Agrícolas Produzem Furfural. *Química e Derivados*. 32-37.
- REUSSER, F.; SPENCER, J.F.T. e SALLANS, H.R. 1958. Protein and Fat Content of Some Mushroom Grown in Submerged Culture. *Appl. Microbiology*. 6: 1-4.
- REUSSER, F.; SPENCER, J.F.T. e SALLANS, H.R. 1961. *Tricholoma nudum* as a Source of Microbial Protein. *Appl. Microbiology*. 6: 5-8.

- RAJAGOPAL M.V. 1977. Microbial Protein from Corn Waste. *J. Fd. Technology* 12: 663-667.
- ROBERTS, L.P. 1950. Influence of Aeration on Rate of Growth in Cultures. *Nature*. 165: 494-495.
- ROBERTS, L.P. 1953. Bacteria Coli as a Food Supplement. *Nature*. 172: 351-352.
- SANCHES-MARROQUIN, A., C. ZERMENO, A. ZAMARRIPA e J. GARCIA. 1966. Nuevo Substrato para la Propagacion de Levedura Alimenticias en Escala de Laboratório. *Revista Latinoamericana de Microbiologia e Parasitologia*, 8: 189-195.
- SAVAGE, J., W.A. MAXWELL, T. CHASE e J.D. MACMILLAN. 1973. Microbial Conversion of Swine Waste to Single Cell Protein. *Global Impacts of Appl. Microbiology, IVth International Conference. Abstracts*, p. 24.
- SEKERI - PATARYAS, K.E., K.A. MITRAKOS, e M.K. GEORGI., 1973. Yields of Fungal Protein from Carob Sugars. *Econ. Bot.* 27: 311-319.
- SPICES, A., 1971. Protein Production by Micro-fungi. *Trop. Sci*, 13: 239-263.
- STAKHORSKAYA, L.H. e KATS, N.I. 1968. Effect of Hydroxymethyl Furfural on Yeast Grown in Continuous Cultures. *Chemical Abst.* 1970. 72: 10240d.

STEINBERG, R.A., 1939^a. Relation of Carbon Nutrition to Trace-elements and Accessory Requirements of *Aspergillus niger*. *J. Agr. Res.* 59: 749-763.

STEINBERG, R.A. 1939^b. Growth of Fungi in Synthetic Nutrient Solution. *Bot. Review.* 5: 327-350.

STEINBERG, R.A. 1942. Effect of Trace Elements on Growth of *Aspergillus niger* with Amino Acids. *J. Agr. Res.* 64: 455-475.

STESSEL, H.J. SAVAGE e W.A. MAXWELL. 1973. Kinetic Studies in Mixed Culture Fermentation of Swine Waste. *Global Impacts of Appl. Microbiology, IVth International Conference. Abstracts.* p. 26.

TAKATA, R. 1929. *Journal of the Society of Chemistry and Industry (Japan)* 32: 243-244. In: THATCHER, F.S. 1954. Foods and Feeds from Fungi. *Annual Review of Microbiology*, 8: 449-472.

TANNENBAUM, S.R. e S.A.MILLER, 1967. Effect of Cell Fragmentation on Nutritive Value of *Bacillus megaterium* Protein. *Nature (London)*, 214: 1261-1262.

TAVARES, F.C.A. 1974. Genetic Improvement of *Saccharomyces cerevisiae* for Single Cellprotein Production. *Genetics of Industrial Microorganisms. IInd International Symposium. Abstracts* p. 97.

THATCHER, F.S. 1954. Foods and Feeds From Fungi. *Annual Review of Microbiology*, 8: 449-472.

- VAN LANEN, J.M. e TANNER Jr., F.W. 1948. Vitamins in Microorganisms Distribution and Quantitative Synthesis. Vitam. and Horm; New York, 6: 163-215.
- VOGEL, H., 1950. Chemie und Technik der Vitamine. Stuttgart, Ferdinand Enke, 2: 485 p.
- VON LOECKE, H.W. 1946. Controversial Aspects: Yeast in Human Nutrition. *J. of the American Dietetic Association*, 22: 485-493.
- WASLIEN, C.I., D.M. COLLOWAY e S. MARGEN. 1968. Uric Acid Production of Men Feol Graded Amounts of Egg Protein and Yeast Nucleic Acid. *Annual J. of Clinics and Nutrition*. 21: 892-894.
- WASLIEN, C.I., D.M. COLLOWAY e S.MARGEN. 1969. Human Intolerance to Bacteria Food. *Nature* (London). 221: 84-85.
- YANG, H.H., YANG, S.P. e THAYER, D.W. 1977. Evaluation of the Protein Quality of Single Cell Protein Produced from Mesquite. *J. Fd. Sci.* 42 (5): 1247-1250.

A P Ê N D I C E

1. Resultados da produção de massa micelial *A. niger* (g/62,5 ml), dos experimentos com diferentes condições nutricionais, nos níveis de substituição do meio sintético pelo licor.

1.1. Substituição pura e simples (Licor não Tratado).

Concentração do licor (%)	Repetições			média
	I	II	III	$\bar{X}$
0	0,34	0,34	0,33	0,34
5	0,34	0,41	0,32	0,36
10	0,36	0,39	0,35	0,37
15	0,34	0,34	0,36	0,35
20	0,37	0,35	0,40	0,37
25	0,42	0,40	0,42	0,41
30	0,44	0,43	0,41	0,43
35	0,48	0,47	0,47	0,47
40	0,49	0,48	0,47	0,48

1.2. Substituição pura e simples (Licor Tratado)

Concentração do licor (%)	Repetições			média
	I	II	III	$\bar{X}$
0	0,36	0,32	0,32	0,34
10	0,40	0,38	0,38	0,39
20	0,49	0,49	0,47	0,48
30	0,49	0,48	0,53	0,50
40	0,58	0,55	0,56	0,56
50	0,50	0,50	0,47	0,49
60	0,41	0,51	0,43	0,45
70	0,35	0,39	0,42	0,39
80	0,34	0,31	0,34	0,33
90	0,26	0,29	0,26	0,27

1.3. Substituição pura e simples com sais balanceados (Licor Tratado)

Concentração do licor (%)	Repetições			média
	I	II	III	$\bar{X}$
0	0,35	0,35	0,38	0,36
10	0,43	0,44	0,44	0,44
20	0,51	0,52	0,55	0,53
30	0,56	0,52	0,58	0,55
40	0,61	0,57	0,60	0,59
50	0,73	0,61	0,63	0,66
60	0,66	0,67	0,80	0,71
70	0,76	0,80	0,73	0,76
80	0,67	0,67	0,69	0,68
90	0,65	0,69	0,69	0,68
100	0,45	0,42	0,44	0,44

1.4. Substituição com balanceamento de nutrientes e carbono (Licor Tratado)

Concentração do licor (%)	Repetições			média
	I	II	III	$\bar{X}$
0	0,34	0,36	0,30	0,34
5	0,33	0,32	0,34	0,33
10	0,31	0,32	0,32	0,32
15	0,30	0,30	0,28	0,29
20	0,30	0,31	0,30	0,30
25	0,32	0,33	0,32	0,32
30	0,36	0,35	0,38	0,36
35	0,40	0,41	0,39	0,40
40	0,39	0,42	0,38	0,40
60	0,53	0,55	0,59	0,56
80	0,70	0,55	0,59	0,61

1.5. Substituição com balanceamento de nutrientes e carbono e ajuste do pH (Licor Tratado)

Concentração do licor (%)	Repetições			média
	I	II	III	$\bar{X}$
0	0,30	0,29	0,32	0,30
5	0,28	0,28	0,30	0,29
10	0,29	0,29	0,30	0,29
15	0,32	0,33	0,31	0,32
20	0,35	0,34	0,34	0,34
25	0,38	0,37	0,38	0,38
30	0,44	0,43	0,44	0,44
35	0,49	0,45	0,41	0,45
40	0,48	0,42	0,44	0,45
60	0,59	0,60	0,63	0,61
80	0,67	0,80	0,69	0,75
100	0,85	0,91	0,80	0,85

1.6. Substituição com balanceamento de nutrientes, carbono e ajuste do pH (Licor não Tratado)

Concentração do licor (%)	Repetições			média
	I	II	III	$\bar{X}$
0	0,36	0,32	0,32	0,34
5	0,28	0,29	0,28	0,28
10	0,34	0,33	0,29	0,32
15	0,33	0,36	0,35	0,35
20	0,31	0,38	0,38	0,38
25	0,38	0,40	0,41	0,40
30	0,44	0,46	0,48	0,46
35	0,57	0,64	0,50	0,57
40	0,46	0,53	0,45	0,48
60	0,45	0,44	0,49	0,46

2. Resultados da proteína % no micélio de *A. niger* dos experimentos com diferentes condições nutricionais, nos níveis de substituição do meio sintético pelo licor.

2.1. Substituição pura e simples (Licor não Tratado).

Concentração do licor (%)	Repetições			média
	I	II	III	$\bar{X}$
0	31,37	31,37	31,37	31,37
5	30,56	29,19	30,19	29,98
10	33,19	32,63	33,38	33,07
15	34,56	34,69	35,63	34,96
20	40,31	38,39	36,75	38,48
25	34,94	35,00	35,31	35,08
30	38,06	37,94	38,13	38,04
35	41,06	42,13	40,00	41,06
40	45,56	43,63	46,50	45,23

2.2. Substituição pura e simples (Licor Tratado)

Concentração do licor (%)	Repetições			média
	I	II	III	$\bar{X}$
0	34,10	34,10	34,10	34,10
10	34,88	36,56	37,13	36,19
20	35,81	36,06	35,00	35,62
30	28,31	30,00	29,63	29,31
40	32,81	26,31	29,19	29,44
50	33,19	32,75	27,19	31,04
60	34,31	27,25	33,81	31,79
70	34,69	33,78	32,94	33,80
80	32,94	34,50	32,56	33,33
90	26,06	24,00	25,63	25,23

2.3. Substituição pura e simples com sais balanceados (Licor Tratado).

Concentração do licor (%)	Repetições			média
	I	II	III	$\bar{X}$
0	31,11	31,11	31,11	31,11
10	37,69	37,25	38,44	37,79
20	36,00	36,69	37,75	36,81
30	36,94	35,88	37,06	36,63
40	36,06	37,06	36,31	36,48
50	35,31	36,09	36,06	35,82
60	34,31	34,13	34,13	34,19
70	34,44	34,88	34,25	34,52
80	34,13	33,31	33,94	33,79
90	36,44	35,13	34,75	35,44
100	42,69	44,69	45,00	44,13

2.4. Substituição com carbono, sais balanceados sem ajuste de pH (Licor Tratado)

Concentração do licor (%)	Repetições			média
	I	II	III	$\bar{X}$
0	31,84	31,84	31,84	31,84
5	26,75	31,56	29,94	29,42
10	33,94	32,00	33,44	33,13
15	34,63	33,75	35,13	34,50
20	35,19	33,50	34,44	34,38
25	34,94	35,63	36,81	35,79
30	35,19	38,38	40,19	37,92
35	35,19	36,38	36,00	35,86
40	33,25	39,69	34,44	35,79
60	36,50	36,94	38,19	37,21
80	37,19	35,00	35,38	35,86

2.5. Substituição com carbono, sais balanceados com ajuste de pH
(Licor Tratado)

Concentração do licor (%)	Repetições			média
	I	II	III	$\bar{X}$
0	31,91	-	-	31,91
5	32,56	31,31	32,31	32,06
10	32,62	33,43	31,06	32,37
15	33,50	31,44	33,87	32,94
20	33,63	32,56	33,87	33,35
25	34,25	34,06	32,81	33,71
30	33,37	33,69	33,18	33,41
35	36,31	32,37	33,50	34,06
40	35,81	36,43	36,37	36,00
60	33,62	32,68	30,44	32,24
80	29,68	29,81	29,40	29,63
100	31,43	29,50	28,13	29,69

2.6. Substituição com carbono, sais balanceados com ajuste de pH
(Licor não Tratado)

Concentração do licor (%)	Repetições			média
	I	II	III	$\bar{X}$
0	31,97	-	-	31,97
5	30,38	26,56	30,88	29,27
10	30,38	30,13	30,00	30,17
15	31,69	29,94	32,50	31,38
20	31,56	31,06	31,56	31,39
25	30,94	32,50	30,56	31,33
30	33,88	33,25	30,38	32,50
35	33,69	29,50	38,00	33,73
40	39,75	36,06	31,75	35,85
60	35,75	36,19	39,68	37,21

3. Resultados da proteína total (g/litro) de *A. niger*, dos experimentos com diferentes condições nutricionais, nos níveis de substituição do meio sintético pelo licor.

3.1. Substituição pura e simples (Licor não Tratado)

Concentração do licor (%)	Repetições			média
	I	II	III	$\bar{X}$
0	1,71	1,71	1,66	1,69
5	1,66	1,91	1,55	1,71
10	1,91	2,04	1,87	1,94
15	1,88	1,89	2,05	1,94
20	2,39	2,15	2,35	2,30
25	2,35	2,24	2,37	2,32
30	2,68	2,61	2,50	2,60
35	3,15	3,17	3,00	3,11
40	3,57	3,35	3,50	3,47

3.2. Substituição pura e simples (Licor Tratado)

Concentração do licor (%)	Repetições			média
	I	II	III	$\bar{X}$
0	1,96	1,75	1,75	1,82
10	2,23	2,23	2,26	2,24
20	2,81	2,83	2,71	2,78
30	2,22	2,30	2,51	2,34
40	3,05	2,32	2,62	2,66
50	2,66	2,62	2,04	2,44
60	2,25	2,22	2,33	2,27
70	1,94	2,08	2,21	2,08
80	1,79	1,71	1,77	1,76

3.3. Substituição pura e simples com sais balanceados (Licor Tratado)

Concentração do licor (%)	Repetições			média
	I	II	III	$\bar{X}$
0	1,89	1,89	2,04	1,94
10	2,59	2,62	2,71	2,64
20	2,94	3,05	3,32	3,10
30	3,31	2,98	3,44	3,24
40	3,52	3,38	3,49	3,46
50	4,12	3,58	3,64	3,78
60	3,62	3,66	4,37	3,88
70	4,19	4,46	4,00	4,21
80	3,66	3,57	3,75	3,66
90	3,79	3,88	3,84	3,83
100	3,07	3,00	3,17	3,08

3.4. Substituição com carbono, sais balanceados sem ajuste de pH (Licor Tratado)

Concentração do licor (%)	Repetições			média
	I	II	III	$\bar{X}$
0	1,73	1,83	1,53	1,70
5	1,41	1,62	1,63	1,55
10	1,68	1,64	1,71	1,68
15	1,66	1,62	1,57	1,62
20	1,69	1,66	1,65	1,67
25	1,78	1,88	1,88	1,85
30	2,03	2,15	2,44	2,21
35	2,25	2,39	2,25	2,30
40	2,07	2,67	2,09	2,38
60	2,51	2,66	2,99	2,72
80	4,17	3,08	3,34	3,53

3.5. Substituição com carbono e sais balanceados com ajuste de pH (Licor Tratado)

Concentração do licor (%)	Repetições			média
	I	II	III	$\bar{X}$
0	1,53	1,48	1,63	1,55
5	1,46	1,40	1,55	1,47
10	1,51	1,55	1,49	1,52
15	1,71	1,66	1,68	1,68
20	1,88	1,77	1,84	1,83
25	2,08	2,02	2,00	2,03
30	2,35	2,32	2,34	2,34
35	2,85	2,33	2,20	2,46
40	2,75	2,45	2,56	2,59
60	3,17	3,14	3,07	3,13
80	3,18	3,82	3,71	3,57
100	4,28	4,29	3,60	4,06

3.6. Substituição com carbono, sais balanceados com ajuste de pH (Licor não Tratado)

Concentração do licor (%)				
	I	II	III	$\bar{X}$
0	1,84	1,64	1,64	1,71
5	1,93	1,75	1,96	1,88
10	2,35	2,26	1,98	2,20
15	2,38	2,45	2,58	2,47
20	2,66	2,68	2,72	2,69
25	2,67	2,95	2,85	2,82
30	3,39	3,48	3,31	3,39
35	4,36	4,29	4,32	4,32
40	4,16	4,35	3,24	3,92
60	3,66	3,62	4,42	3,90