OBTENÇÃO DE PROTEÍNA MICROBIANA PARA RAÇÃO ANIMAL
A PARTIR DO HIDROLISADO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

SUELO NEGRETTO CRUZ
Engenheiro-Agrônomo

Orientador: JOSÉ PAULO STUPIELLO

Dissertação apresentada à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz" da Universidade de São
Paulo, para obtenção do título
de Mestre em Agronomia. Área de
concentração: Ciência e Tecnologia
de Alimentos.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Maio - 1990

Ficha Catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

Cruz, Sueli Negretti

C957o Obtenção de proteína microbiana para ração animal
a partir do hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar.
Piracicaba, 1990.
89p.

Diss. (Mestre) - ESALQ
Bibliografia.

1. Animal doméstico - Nutrição 2. Bagaço de cana-
de-açúcar hidrolisado 3. Levedura - Crescimento 4. Le-
vedura em ração 5. Proteína microbiana em ração 6. Ra-
ção - Enriquecimento protéico I. Escola Superior de A-
gricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 664.1228

OBTENÇÃO DE PROTEÍNA MICROBIANA PARA RAÇÃO ANIMAL
A PARTIR DO HIDROLISADO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Aprovada em: 24.08.1990

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. José Paulo Stupiello ESALQ/USP

Prof. Dr. Jorge Horii ESALQ/USP

Prof. Dr. Luiz Gonzaga de Souza FCAB/UNESP

PROF. DR. JOSÉ PAULO STUPIELLO

Orientador

Aos meus pais

Otávio e Amália

Ao meu marido

Vivaldo

Aos meus filhos Eduardo,

Flávio, Adriana e Renato

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. José Paulo Stupiello, orientador dessa dissertação, pela dedicação e pela cuidadosa revisão crítica do texto original.

- Aos Professores Dr. Jorge Horii, Dr. Marco Antonio A. Cesar, Dr. Fernando V. Novaes, Dr. João G. Brasil Caruso, Dr. Luiz E. George Barrichelo e Dr. Nadir Almeida da Glória pela atenção dispensada durante a execução deste trabalho.
- Aos funcionários Edson Franzoni, Sylvino L. Torrezan, Rosemary L. da S. Mandro e José Emílio Q. de Almeida pela colaboração nas análises de laboratório.
- A Gislaíne M.M. de Oliveira pelos serviços de datilografia prestados.
- Aos funcionários do Departamento de Tecnologia Rural pela colaboração e em especial ao Sr. Constante Cristofolletti.
- A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE FIGURAS	vii.
LISTA DE TABELAS	viii.
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xi.
RESUMO	xii.
SUMMARY	xv.
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. Bagaço de Cana-de-açúcar	4
2.1.1. Composição química do bagaço	4
2.2. Hidrólise do Bagaço	9
2.2.1. Reações de hidrólise	9
2.2.2. Produtos da decomposição de açúcares ..	14
2.3. Conversão de D-xilose e D-xilulose-5 Fosfato por Levedura	16
2.4. Fermentação	18
2.4.1. Misturas de pentoses e hexoses	18
2.4.2. Hidrolisados lignocelulósicos	21
2.5. Levedura	27
2.5.1. Considerações gerais	27
2.5.2. Composição química da levedura	30
2.5.3. Valor nutritivo da levedura	35
2.5.4. Efeito tóxico da levedura	40

	Página
3. MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1. Matéria-Prima	43
3.2. Substratos para Fermentação	43
3.2.1. Extrato de bagaço	43
3.2.2. Licor de Bagaço	44
3.3. Determinações Analíticas	44
3.4. Inóculo	47
3.5. Suplementação de Sais dos Substratos	48
3.6. Descrição dos Equipamentos	48
3.7. Descrição de um Ensaio Típico	49
3.8. Variação do Ensaio Típico	51
3.9. Cálculo dos Rendimentos	52
3.9.1. Rendimento do substrato (η_s)	52
3.9.2. Rendimento biológico (η)	52
3.10. Cálculo das Eficiências	52
3.10.1. Eficiência do processo biológico (ϵ)..	52
3.10.2. Eficiência do processo em relação ao açúcar total do substrato (ϵ_s)	53
3.11. Cálculo da Razão de Crescimento Celular (R_x)..	53
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1. Pré-Hidrólise	54
4.2. Ensaio	55

	Página
4.2.1. Ensaio I (sem aeração)	56
4.2.2. Ensaios II, III, IV e V (com aeração) ..	60
4.2.3. Ensaios VI, VII, VIII e IX (com aeração e suplementação de sais)	68
5. CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Metabolismo de D-xilose em bactérias e D-xilose em leveduras (KLING <i>et alii</i> , 1985).	17
2	Esquema das análises realizadas em um ensaio típico.	50

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Composição em monossacarídeos das hemiceluloses e o resíduo após a extração, expressos em matéria seca.	10
2	Composição do bagaço em aminoácidos e o resíduo após a extração da hemicelulose, expressos em matéria seca.	11
3	Crescimento de várias culturas de levedura em hidrolisados lignocelulósicos durante 24 horas.	23
4	Composição elementar de leveduras comerciais e melaço.	31
5	Composição em aminoácidos essenciais de leveduras alimentares comerciais.	33
6	Umidade % bagaço, Brix, pH, açúcar total (AT) e AT% bagaço do extrato do digestor e do licor. .	46
7	Teores de nutrientes minerais no extrato e no licor de bagaço.	47
8	Açúcares do licor de bagaço.	47
9	Condições experimentais do Ensaio I (sem aeração).	56
10	Valores de M_{xf} ; M_x ; A_r ; A_c ; $A_c\%$ de AT no Ensaio I.	58
11	Valores de R_x ; η_s , η , ε e ε_s para o Ensaio I.	58

Tabela		Página
12	pH e acidez acética do Ensaio I.	60
13	Condições experimentais dos Ensaios II, III, IV e V (com aeração).	60
14	Valores de M_{xf} ; M_x ; A_r ; A_c ; $A_c\%$ de AT nos Ensaios II, III, IV e V.	62
15	Valores de R_x , η_s , η , ε e ε_s para os Ensaios II, III, IV e V.	63
16	Dosagens de Etanol no Ensaio IV (ml/100ml). ...	64
17	pH e acidez acética dos Ensaios II, III, IV e V.	67
18	Condições experimentais dos Ensaios VI, VII, VIII e IX (com aeração e suplementação de sais)	68
19	Valores de R_x ; η_s , η , ε_s e ε para os Ensaios VI, VII, VIII e IX.	69
20	Valores de M_{xf} ; M_x ; A_r ; A_c ; $A_c\%$ de AT nos Ensaios VI, VII, VIII e IX.	71
21	pH e acidez acética dos Ensaios VI, VII, VIII e IX.	73
22	Rendimento em massa seca de células de levedura em relação ao açúcar total do extrato do digestor e do licor (%). (Média de 3 repetições para η_s).	74

Tabela	Página
23 Rendimentos médios em leveduras em relação aos açúcares totais do licor e extrato em kg por 100 kg bagaço.	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- A_c - Açúcar total consumido na fermentação, calculado como açúcar invertido (mg).
- A_r - Açúcar residual da fermentação, calculado como açúcar invertido (mg).
- AT - Açúcar total calculado como açúcar invertido (mg).
- AT_1 - AT para extrato.
- AT_2 - AT para licor.
- M_x - Massa de células de leveduras seca obtidas na fermentação (mg).
- M_{xo} - Massa inicial de células de leveduras seca (mg).
- M_{xf} - Massa de células de leveduras seca no final da fermentação (mg).
- R_x - Razão de crescimento celular (%).
- U_x - Umidade do fermento prensado (%).
- V - Volume de substrato (ml).
- ϵ - Eficiência do processo biológico. Eficiência do processo relacionada ao açúcar consumido (%).
- ϵ_s - Eficiência do processo relacionada ao açúcar total do substrato (%).
- η - Rendimento do processo biológico. Rendimento em células relacionado ao açúcar consumido (%).
- η_s - Rendimento em células relacionado ao açúcar total do substrato (%).

OBTENÇÃO DE PROTEÍNA MICROBIANA PARA RAÇÃO ANIMAL A PARTIR DO HIDROLISADO DE BAGAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR

Autora: SUELI NEGRETTI CRUZ

Orientador: PROF. DR. JOSÉ PAULO STUPIELLO

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo estudar a possibilidade de crescimento da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, espécie de levedura de fácil manuseio e disponibilidade nas destilarias, em licor, após os tratamentos preconizados para fermentação em hidrolisados lignocelulósicos. A levedura assim obtida seria destinada à ração animal.

Procurou-se comparar o rendimento da levedura crescendo no licor de bagaço de cana-de-açúcar e o rendimento da levedura crescendo no extrato de bagaço de cana-de-açúcar.

O extrato de bagaço foi obtido pelo método do digestor a frio e o licor pelo método da autoclavagem do bagaço úmido à temperatura de 170°C por trinta minutos, numa relação bagaço/água 1:10 (peso seco/volume) em um digestor rotativo.

O extrato de bagaço contém os açúcares residuais do bagaço e o licor os açúcares residuais mais os açúcares provenientes da pré-hidrólise do bagaço.

O licor apresentou 315 ppm de furfural, produto da decomposição das pentoses. Para reduzir o teor de furfural e outros compostos voláteis que inibem a fermentação, o licor foi submetido a um tratamento após o qual o teor de furfural se reduziu a 36 ppm.

Foram realizadas determinações analíticas de Brix, açúcares redutores totais, pH, nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio e magnésio no extrato e no licor.

A inoculação do extrato e do licor foi feita com 1% de fermento prensado. Os ensaios foram de 24 horas em frascos Erlenmeyers agitados: 1) sem aeração; 2) somente com aeração; 3) com aeração e suplementação de nutrientes. Os sais utilizados na suplementação foram uréia e fosfato monobásico de potássio.

Após a centrifugação do vinho determinou-se a matéria seca de células de levedura e no sobrenadante, pH, açúcares residuais e etanol. Foram calculados rendimento em levedura, eficiência do processo e razão de crescimento celular.

Verificou-se que a levedura cresce no pré-hidrolisado de bagaço tratado. Existem substâncias desconhecidas no licor que inibem fermentação. Os melhores rendimentos em células de levedura no licor foram obtidos com aeração e suplementação de nitrogênio e potássio. Nas condições em que

foram realizados os ensaios, o licor com aeração e suplementação de nutrientes apresentou maior rendimento que o extrato em leveduras.

OBTAINING MICROBIAN PROTEIN FROM HYDROLYSATE OF SUGAR CANE BAGASSE FOR ANIMAL FOOD

Author: SUELI NEGRETTI CRUZ

Adviser: PROF. DR. JOSÉ PAULO STUPIELLO

SUMMARY

The purpose of this work was to study the growing possibility of *Saccharomyces cerevisiae*, yeast of easy handling and availability in the distilleries, in liquor, after recommended treatments for fermentation in lignocellulosic hydrolysates. The yeast obtained in this manner would be destined to animal food.

The yield of yeast growing in liquor of sugar cane bagasse was compared to the yield of yeast growing in the extract of sugar cane bagasse.

The bagasse extract was obtained by the cold digester method and the liquor by the wet bagasse autoclave method at the temperature of 170°C for thirty minutes at 1:10 bagasse/water ratio (dry weight/volume) in a rotative digester.

The extract of bagasse contains the residual sugars of the bagasse and the liquor contains the residual

sugars of the bagasse and the sugars from the pre-hydrolysis of the bagasse.

The liquor presented 315 ppm of furfural, product of pentoses decomposition. To reduce the amount of furfural and other volatile compounds which inhibit fermentation, the liquor was submitted to a treatment. After which the amount of furfural was reduced to 36 ppm.

Analytical measurements of Brix, total reducing sugars, pH, nitrogen, phosphorus, potassium, calcium and magnesium were made in the extract and in the liquor.

The yeast inoculum used was 1% of pressed bakery yeast. The essays were of 24 hours in agitated Erlenmeyers flasks: 1) airless without nutrient supply; 2) only with air; 3) with air and nutrient supply. The inorganic salts utilized in the essays were urea and potassium phosphate monobasic.

The dry matter of yeast cells was determined after the wine centrifugation, and the pH, residual sugars and ethanol were determined in the supernatant. Yield of yeast, process efficiency and growth rate of yeast were also calculated.

It was found that the yeast grows in the treated pre-hydrolysate of bagasse. There are unknown substances in the liquor that inhibit fermentation. The best yield in yeast cells in the liquor were found in the treatment with aeration and addition of nitrogen and potassium. In the condition that the essays were carried

out, the liquor with aeration and nutrients supply showed higher yeast cells yield than the extract.

1. INTRODUÇÃO

Da fabricação do álcool e ou açúcar, a partir da cana-de-açúcar, tem-se quatro resíduos: bagaço, torta, vinhaça e mel final. À medida que esses resíduos são explorados economicamente, eles se tornam subprodutos da cana-de-açúcar. Assim, a torta é considerada um subproduto porque é utilizada principalmente na recuperação de solos fracos; vinhaça, na fertirrigação e o mel final, na produção do álcool.

O bagaço é a fração resultante da moagem da cana, da qual foi extraído o caldo e é também um subproduto, sendo cerca de 70% desse bagaço utilizado na geração de energia para a própria fabricação do açúcar e do álcool.

O bagaço (50% de umidade) corresponde cerca de 30% do peso da cana. Considerando a produção do álcool em uma destilaria autônoma de 75 litros por tonelada de cana, tem-se para cada litro de álcool uma produção de 4,0 kg de bagaço, dos quais cerca de 1,2 kg de bagaço é excedente. Nos Estados de Alagoas e Pernambuco as sobras de bagaço aumentam a cada ano. Em Pernambuco ainda existe um pequeno mercado para uso de bagaço na fabricação de papel, queima em caldeira de refinaria de açúcar e das fábricas de tecido. Em São Paulo o bagaço é aproveitado para a produção de celulose

e papel, furfural, conglomerado, volumoso nas rações para animais em confinamento e insumo energético em outras indústrias. Essas indústrias modificaram suas caldeiras para queimar bagaço de cana.

As usinas e destilarias das Regiões de Ribeirão Preto e Piracicaba, têm vendido bagaço a preço que variam entre 70-90% do valor da tonelada de cana.

O maior problema é o transporte do bagaço que "in natura", corresponde a conduzir a metade do seu peso em água. O seu custo pode não ser encorajador quando se considera transporte de bagaço a longas distâncias, necessitando as usinas se aparelharem para beneficiamento do bagaço (secagem e enfardamento) de modo que ele chegue ao consumidor a preços mais competitivos.

Quanto as indústrias, que poderiam utilizar o bagaço, se localizam muito afastadas da usina, uma das sugestões seria aproveitar o bagaço excedente na produção de proteínas microbianas, em instalações anexas às usinas e destilarias, aproveitando o açúcar residual do bagaço que é da ordem de 2-4%.

Segundo HARRISON (1971) um crescimento aeróbico de leveduras como *Saccharomyces cerevisiae* ou *S. uvarum* ou *Candida utilis* pode conduzir à obtenção de um rendimento de massa celular seca de 47,5 g para cada 100 g de glicose ou na prática, a cerca de 43,2 g, o que seria correspondente a 91% do teórico. Assim se a recuperação do açúcar do bagaço for da ordem de 3% haverá a possibilidade de se produzir

cerca de 1,3 kg de matéria seca por cento de bagaço tratado ou 3,9 kg por tonelada de cana aproximadamente. Esta proteína microbiana obtida poderá ser utilizada como suplemento de ração para animais para atender à demanda do produto pela pecuária nacional.

O objetivo desse trabalho foi estudar a possibilidade de crescimento da levedura prensada *Saccharomyces cerevisiae*, espécie de levedura de fácil manuseio e disponível nas destilarias, em licor, produto da autoclavagem do bagaço, após os tratamentos preconizados para fermentação em hidrolisados lignocelulósicos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Bagaço de Cana-de-açúcar

2.1.1. Composição química do bagaço

O bagaço é o resíduo fibroso da cana-de-açúcar após a moagem e extração do caldo, sendo constituído de água, fibras e pequenas quantidades de sólidos solúveis (PATURAU, 1969), nas proporções:

Água	46-52% (média 49,0%)
Fibra	43-52% (média 48,7%)
Sólidos solúveis (maioria açúcares) ...	2-6 % (média 2,3%)

Para PATURAU (1969) a composição química do bagaço, varia com a variedade de cana, maturação, método de colheita e com a eficiência de extração.

Para VALSECHI (1964) a composição química do bagaço, varia com um grande número de fatores ligados à própria composição da cana, à natureza e a intensidade dos métodos de extração; e para o bagaço em depósito, com o processo de armazenamento e o tempo de espera para o

processamento industrial. De um modo geral, pode-se dizer que o bagaço fresco, tal como sai da última moenda das usinas de açúcar, possui, aproximadamente:

Umidade	50%
Fibra	45%
Material solúvel em água	5%

A fibra do bagaço é um composto insolúvel em água, constituído principalmente de celulose, pentosanas e lignina (Valsechi, 1964 e Patureau, 1969) ou de celulose, hemicelulose e lignina (Delgado *et alii* 1986 e Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar, ICIDCA, 1986).

A celulose é um polissacarídeo de fórmula geral $(C_6H_{10}O_5)_n$ e é o principal constituinte dos tecidos vegetais (Patureau, 1969). É insolúvel em água, solventes orgânicos e soluções alcalinas, com apreciável resistência ao efeito de agentes oxidantes (Delgado *et alii* 1986 e ICIDCA, 1986). Raramente ocorre na natureza em estado puro, mas intimamente ligado à lignina, pentosanas, gomas, taninos, gorduras, matérias corantes, etc (Patureau, 1969).

Segundo Patureau, (1969), a celulose é classificada, em relação ao seu grau de solubilidade em soda cáustica, em:

α celulose - insolúvel em soda a 17,5%, à temperatura ambiente.

β celulose - solúvel em soda a 17,5% e facilmente precipitada em solução ácida.

γ celulose - solúvel em soda à 17,5%, não precipitada por ácidos, mas precipitada por álcool.

A α celulose é considerada como a forma pura de celulose, enquanto as solúveis em soda cáustica fria à 17,5%, compõem a hemicelulose.

As hemiceluloses abrangem um conjunto de polissacarídeos diferentes cuja composição tem por característica a solubilidade em solventes, reatividade em meio ácido e decomposição em açúcares e furfural. Estas propriedades as diferenciam, analiticamente do resto dos componentes químicos do bagaço (DELGADO *et alii* 1986 e ICIDCA, 1986).

As hemiceluloses são compostas de unidades de pentoses (PATURAU, 1969).

Holocelulose é o termo usado para indicar ambas, celulose e hemicelulose, (PATURAU, 1969; DELGADO *et alii* 1986 e ICIDCA, 1986).

A lignina é um componente da fibra formada por um grupo de substâncias de alto peso molecular, associado à celulose e hemicelulose. Sua estrutura química é largamente aromática, composta de anéis de benzeno, os quais contém alguns grupos livres e muitos grupos fenólicos metilados, mas a estrutura e tamanho dos polímeros ainda não estão bem estabelecidos (PATURAU, 1969).

O ICIDCA, (1986), considera o bagaço do ponto de vista físico e do ponto de vista químico. Do ponto de vista físico, o bagaço é constituído de quatro frações:

Fibra ou bagaço	45%
Sólidos insolúveis	2-3%
Sólidos solúveis	2-3%
Água	50%

onde:

- a fibra é a fração sólida orgânica insolúvel em água presente no colmo da cana-de-açúcar e que se caracteriza por sua marcante heterogeneidade do ponto de vista químico e morfológico.
- os sólidos insolúveis, de natureza inorgânica, são constituídos fundamentalmente por terra, pedras e outros materiais estranhos, ainda que em pequena quantidade participem da composição do bagaço.
- os sólidos solúveis, fração que se dissolve em água, é composta de maneira fundamental por sacarose, cuja extração ulterior não seria econômica à indústria açucareira e por componentes químicos como cera, mas em menor proporção.
- a água presente no bagaço é retida através de um mecanismo de absorção e capilaridade. O conteúdo de sólidos solúveis e umidade do bagaço estão relacionados com variáveis de operação industrial (ICIDCA, 1986).

Do ponto de vista químico, segundo DELGADO *et alii* (1986) e ICIDCA (1986), o bagaço é constituído de:

Celulose	41-44%
Hemicelulose	25-27%
Lignina	20-22%
Componentes estranhos	máximo 10%

Segundo os mesmos autores, a celulose é um polímero de D-glicose com ligações β 1-4 e peso molecular de 150.000 a 350.000.

As hemiceluloses, com predominância de D-xilanas, possuem cadeias poliméricas curtas e o peso molecular está entre 10.000 e 20.000 e a lignina, o terceiro componente de importância quantitativa no bagaço, é constituída de polímeros amorfos, reticulados de alto peso molecular e de natureza eminentemente fenólica.

O resto dos componentes do bagaço, em conjunto, podem chegar a 10%: compostos solúveis em solventes orgânicos, ao redor de 3% (ICIDCA, 1986) como resinas, ceras, gorduras, ácidos graxos, flavonas, fenóis (DELGADO *et alii* 1986); cinzas da ordem de 2-3% do bagaço e compostos solúveis em água, constituídos por sacarose, outros açúcares e polissacarídeos (DELGADO *et alii* 1986 e ICIDCA, 1986).

2.2. Hidrólise do Bagaço

2.2.1. Reações de hidrólise

Através de reações de hidrólise as cadeias de hemicelulose e celulose, componentes da fibra do bagaço, se decompõem dando açúcares mais simples ou monossacarídeos.

A hidrólise da fração hemicelulose é chamada de pré-hidrólise (DELGADO *et alii* 1986). Os principais produtos da pré-hidrólise são xilose, arabinose, glucose e galactose (DU TOIT *et alii* 1984 e DELGADO *et alii* 1986) e ácidos urônicos (PATURAU, 1969).

A hidrólise da celulose é denominada de hidrólise principal e o produto da reação são unidades de glicose. A pré-hidrólise e hidrólise principal são favorecidas por aumento de temperatura e pela presença de um catalisador ácido (DELGADO *et alii* 1986).

A fim de caracterizar o bagaço de cana-de-açúcar quanto aos monossacarídeos, hemiceluloses e composição em aminoácidos, DU TOIT *et alii* (1984) realizaram hidrólise sucessivas no bagaço com ácido clorídico. A xilose foi o principal componente do hidrolisado enquanto glucose e galactose, presentes nas cadeias laterais das pentosanas, foram libertadas rapidamente. Este tratamento resultou na obtenção de 229 mg de xilose (85% do máximo teórico) e 44 mg de glicose por grama de bagaço. Somente arabinose (2,8 mg/g) e galactose (0,75 mg/g) também estavam presentes em quanti-

dades detectáveis. Um total de 309 mg de monossacarídeos foram obtidos de 1 grama de bagaço por este tratamento (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição em monossacarídeos das hemiceluloses e o resíduo após a extração, expressos em matéria seca.

MONOSSACARÍDEOS PRESENTES	% VERDADEIRA (T)	% RELATIVA (R)	ORIGINAL (O)
Hemicelulose A:			
Arabinose	3,98	5,96	0,74
Galactose	0,37	0,55	0,07
Xilose	54,66	81,83	10,08
Glicose	7,79	11,66	1,44
Total para hemicelulose A	66,80	100,00	12,33
Hemicelulose B:			
Arabinose	16,76	19,73	2,50
Galactose	5,32	6,26	0,99
Xilose	43,69	51,44	8,13
Glicose	19,18	22,57	3,57
Total para hemicelulose B	84,95	100,00	15,19
Resíduo após extração:			
Arabinose	2,67	13,70	1,62
Galactose	0,80	4,81	0,48
Xilose	11,51	59,07	6,96
Glicose	4,37	22,42	2,64
Total para resíduo	19,35	100,00	11,70

Fonte: DU TOIT *et alii* (1984).

T - Porcentagem de monossacarídeos expressa como porcentagem verdadeira, recalculada como porcentagem da quantidade do material original hidrolisado.

R - Porcentagem de monossacarídeos expressa como porcentagem relativa recalculada como porcentagem do total de monossacarídeos presentes.

O - É a porcentagem da quantidade de material original prévia à extração de hemicelulose.

Aminoácidos e peptídeos ou proteínas também foram extraídos com álcali-diluído. Os resultados obtidos nesse trabalho estão na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição do bagaço em aminoácidos e o resíduo após a extração da hemicelulose, expressos em matéria seca.

AMINOÁCIDOS	BAGAÇO		RESÍDUO APÓS EXTRAÇÃO DA HEMICELULOSE	
	($\mu\text{mol/g}$)	% (g/g)	($\mu\text{mol/g}$)	% (g/g)
Ácido aspártico	9,270	0,1234	2,608	0,347
Treonina	0,412	0,0049	-	-
Serina	6,276	0,0660	1,689	0,0178
Ácido glutâmico	8,997	0,1320	2,866	0,0420
Prolina	-	-	-	-
Glicina	12,706	0,0955	3,426	0,0257
Alanina	9,866	0,0879	2,984	0,0266
Cisteína	-	-	-	-
Valina	7,282	0,0853	2,968	0,0348
Metionina	0,731	0,0109	0,090	0,0013
Isoleucina	3,947	0,0518	1,191	0,0156
Leucina	7,696	0,1010	3,118	0,0409
Tirosina	1,228	0,0223	-	-
Fenilalanina	3,148	0,0520	0,863	0,0142
Histidina	1,276	0,0198	0,0261	0,0036
Lisina	2,429	0,0355	1,319	0,0193
NH ₃	16,604	0,0283	8,517	0,0145
Arginina	3,096	0,0539	0,453	0,0079
TOTAL	94,964	0,9705	32,353	0,2989
TOTAL sem NH ₃	78,360	0,9422	23,836	0,2844

Fonte: DU TOIT *et alii*, 1984.

NOTA: Quantidades não detectáveis em prolina, cisteína e resíduos de treonina e tirosina.

KLING *et alii* (1987) estudando a hidrólise enzimática no bagaço de cana-de-açúcar, pré-tratado por vapor a diferentes temperaturas e tempo de tratamento, seguido de descompressão rápida do bagaço, encontraram um potencial no bagaço de 47% de açúcares redutores fermentescíveis (açúcares relacionados ao conteúdo de celulose); 26% de açúcares redutores não fermentescíveis (açúcares relacionados ao conteúdo de hemicelulose); 23% de lignina e cerca de 4% de cinzas e outros resíduos.

Ainda segundo esses autores, a hidrólise da fração hemicelulose durante o tratamento por vapor envolve a solubilização da hemicelulose e parcial destruição dos açúcares redutores produzidos. A quantidade de açúcares redutores recuperados da hemicelulose pré-tratada é função do tempo e da temperatura de tratamento. As condições nas quais houve máximo rendimento na hidrólise de hemicelulose, foram:

220°C / 2 minutos

210°C / 3 minutos

200°C / 6 minutos

190°C / 10-15 minutos

Aumentando o tempo de tratamento verificaram um incremento na hidrólise da hemicelulose, com maior grau de degradação de açúcar. Há uma hidrólise incompleta da hemicelulose a oligossacarídeos pelo tratamento a vapor,

verificada pela diferença entre os açúcares redutores não fermenticíveis recuperados da hemicelulose antes e após hidrólise, com ácido sulfúrico.

Segundo LACORTE *et alii* (1986) o tratamento do bagaço de cana-de-açúcar por vapor pode ser feito em operação contínua ou em batelada e consiste de duas fases distintas:

1. Fase de auto-hidrólise: Nesta fase o bagaço de cana (ou outro resíduo lignocelulósico) é acondicionado em uma câmara de pressão e submetido a elevada pressão e temperatura através de injeção de vapor. Nestas condições ocorre clivagem de radicais acetil da hemicelulose, com formação de ácido acético, que promove a hidrólise ácida da própria hemicelulose até suas hexoses e pentoses formadoras.
2. Fase de descompressão rápida: Nesta fase o vapor contido na câmara de pressão, ao final do tratamento, é repentinamente liberado e a água contida nos fragmentos de bagaço vaporiza-se subitamente e sofre violenta expansão, promovendo o "afrouxamento" do material.

Os processos físicos como intumescimento, moagem, vaporização, etc., são utilizados para aumentar o tamanho dos poros, aumentando a área exposta, e para reduzir a cristalinidade da celulose (MENEZES & HIOSHII, 1981/82).

2.2.2. Produtos da decomposição de açúcares

Nas reações de hidrólise, o aumento da concentração do ácido, bem como da temperatura, aumenta a velocidade de reação de hidrólise e da decomposição de açúcares (DELGADO *et alii* 1986 e KLING *et alii* 1987).

O produto da decomposição das hexoses é o hidroximetilfurfural e das pentoses é o furfural (HAJNY, 1981; JEFFRIES, 1983 e DELGADO *et alii* 1986).

O hidroximetilfurfural pode ser decomposto posteriormente em ácido fórmico e ácido levulínico (HAJNY, 1981), sendo o ácido fórmico altamente tóxico às leveduras (KATAGIRI, 1926).

A reação da pré-hidrólise ocorre em condições mais suaves que a hidrólise principal, por esse motivo, segundo DELGADO *et alii* (1986) é conveniente realizá-la separadamente para evitar a decomposição de xilose em furfural.

Os hidrolisados ácidos de hemicelulose são substancialmente mais difíceis de serem utilizados por microrganismos que as correspondentes misturas de açúcares puros. Esse fato é atribuído largamente à presença de produtos de degradação de açúcares, principalmente furfural (JEFFRIES, 1983).

Hidroximetilfurfural também afeta o crescimento de leveduras e segundo STAKHORSKAYA & KATS (1968), a concentração limite de hidroximetilfurfural é 0,1% para crescimento de levedura em meio sintético e 0,2% em hidroli-

sados. Durante o crescimento, o teor de hidroximetilfurfural no meio é reduzido devido ao metabolismo pelas células de leveduras e pelas reações do hidroximetilfurfural com os componentes do hidrolisado. Isso explica porque o nível suportável de hidroximetilfurfural pela levedura é maior no hidrolisado que no meio sintético.

Segundo PETROVIC (1969) houve crescimento, assimilação e atividade bioquímica de levedura em concentrações de 0,04-0,2% de furfural em meio sintético ou em hidrolisado e a adaptação ao aumento de concentração se deu de modo gradual. As espécies *Torulopsis utilis*, variedade *major* e *T. utilis* suportaram melhor concentrações mais altas de furfural que *Candida utilis*.

GUSAROVA (1970) observou que o furfural inibiu a síntese protéica independentemente do estado fisiológico das células de levedura, quando adicionado 0,1% (vol/vol) em cultura de *Candida tropicalis* em meio sintético. Alguns experimentos realizados por LEONARD, em trabalho não publicado, segundo LEONARD & HAJNY (1945), demonstraram que a destilação a vapor foi benéfica à fermentação quando mais de 0,1% de furfural estava presente no hidrolisado e que outros compostos voláteis também foram removidos pela destilação.

BANERJEE *et alii* (1981) constataram que furfural, produto da reação de Maillard, inibiu crescimento e produção alcoólica por *Saccharomyces cerevisiae*, e as enzimas desidrogenases parecem ser as mais sensíveis e provavelmente as responsáveis pela inibição observada no

crescimento da levedura e produção alcoólica. Não houve inibição de crescimento ao nível de 0,5 mg de furfural por mililitro de meio sintético.

Em pré-hidrolisado ácido de carvalho (*Quercus falcata*), TRAN & CHAMBERS (1986) identificaram como compostos inibidores da fermentação por *Pichia stipitis*, furfural e ácido acético provenientes de hemicelulose, vanilina, aldeído siríngico, ácido vanílico e ácido siríngico provenientes de lignina e ácidos capróico, caprílico, pelargônico e palmítico, dos extrativos da madeira.

WEIGERT *et alii* (1988) estudaram a influência da adição de furfural sobre o crescimento aeróbico da levedura *Pichia stipitis* e verificaram que o furfural adicionado foi rapidamente reduzido a álcool furfurílico. O furfural inibiu a respiração e o produto álcool furfurílico influenciou a taxa de crescimento de *Pichia stipitis*. Concluíram também que a enzima alcooldesidrogenase foi a principal responsável pela redução de furfural a álcool furfurílico.

2.3. Conversão de D-xilose a D-xilulose-5 Fosfato por Levedura

Em leveduras, o transporte de D-xilose para dentro da célula pode ocorrer por difusão facilitada ou por processo ativo (JEFFRIES, 1983). Uma vez dentro da célula de levedura, há dois possíveis caminhos para leveduras converter D-xilose a D-xilulose 5 fosfato, o qual é um

intermediário no ciclo pentose fosfato: D-xilose pode ser submetida a uma reação de redox a D-xilulose, com xilitol como um intermediário ou D-xilose pode ser isomerizada diretamente a D-xilulose por D-xilose isomerase quando esta é adicionada. D-xilulose assim formada seria então fosforilada por D-xilulose quinase a D-xilulose 5 fosfato e canalizada para dentro do ciclo pentose fosfato (GONG *et alii*, 1981).

Segundo JEFFRIES, (1983), as bactérias geralmente empregam uma isomerase para converter D-xilose a D-xilulose, Figura 1-A, enquanto as leveduras e fungos executam a mesma conversão através de dois passos: de redução e oxidação, Figura 1-B.

Figura 1 - Metabolismo de D-xilose em bactérias e D-xilose em leveduras (KLING *et alii*, 1985).

Muitas leveduras são capazes de converter D-xilose a D-xilulose aerobicamente, mas nenhuma é ainda conhecida como capaz de utilizar D-xilose anaerobicamente (JEFFRIES, 1983), exceto quando isomerases exógenas são adicionadas (GONG *et alii*, 1981).

Segundo JEFFRIES (1983), a enzima que cataliza a redução de D-xilose a D-xilitol, em leveduras e fungos, está na dependência de NADPH e D-xilitol desidrogenase está na dependência de NAD. A reação de D-xilitol a D-xilulose é prontamente reversível, ocorrendo a oxidação de NADH com certo número de cetoses nas quais estão envolvidas D-xilulose, D-frutose e D-ribulose.

2.4. Fermentação

2.4.1. Misturas de pentoses e hexoses

A utilização de misturas de D-xilose com D-glucose e L-arabinose é de particular importância porque esses açúcares estão todos presentes em hidrolisados de resíduos agrícolas e florestais.

Experimentos foram realizados por BORZANI & AQUARONE (1958) para determinar a influência de arabinose sobre a fermentação de glucose por *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-684. Os autores verificaram que a taxa de produção de CO₂ aumenta na presença de arabinose como também o intervalo ótimo de pH da levedura, mas os rendimentos em álcool, com e sem arabinose são os mesmos. A redução do pH do meio durante

a fermentação na presença de arabinose é menor do que a observada no meio de cultura contendo somente glucose. A concentração de arabinose decresce quando a levedura fermenta glucose. A arabinose não é fermentada pela levedura estudada. A inoculação do meio contendo somente arabinose como a fonte maior de carbono resulta em quase completa destruição da levedura.

FANTI & KOHAN (1963) trabalhando com açúcares puros, glucose ou xilose e com misturas dos mesmos açúcares verificaram que a levedura *Torula utilis* apresentava um comportamento distinto com relação ao consumo desses dois açúcares. Os ensaios foram realizados com líquidos hidrolisados constituídos exclusivamente por hexoses e misturas de pentoses e hexoses em proporções distintas e com a mesma levedura. Os autores constataram que a cepa de *Torula utilis* é capaz de aproveitar hexoses e pentoses separadamente com alta porcentagem de fermentação; que em uma mistura de ambos os açúcares provenientes dos hidrólisados, a porcentagem de fermentação diminui, chegando a um valor máximo de 60-65%, depois de um processo de aclimação; que ao predominar açúcares de 5 átomos de carbono no líquido, a levedura fermenta em maior proporção estes açúcares que as hexoses e nos líquidos com maior conteúdo de hexoses, há um maior aproveitamento das hexoses. Concluíram também que nos líquidos ensaiados, nos quais não existiam substâncias inibidoras que prejudicassem sensivelmente o processo, a mistura de açúcares constituiu por si só, um fator inibitório.

HSIAO *et alii* (1982) testaram quatro leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Candida utilis* e *Rhodotorula toruloides*) para verificar sua habilidade em crescer e consumir D-glucose, D-xilose, D-xilulose e D-xilitol separadamente e em várias misturas. D-glucose foi a melhor fonte de carbono para as quatro leveduras. D-xilulose foi consumida mais rapidamente que D-xilose e D-xilitol pela quatro leveduras. *S. cerevisiae* utilizou pouca D-xilulose, *S. cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* foram incapazes de usar D-xilose e D-xilitol para crescimento. Quando D-glucose e D-xilulose estavam presentes no meio de crescimento, o esgotamento de D-glucose não foi afetado pela presença de D-xilulose. Com *R. toruloides* e *S. cerevisiae*, D-xilulose começa a desaparecer do meio, somente quando D-glucose foi totalmente esgotada. Embora D-xilose fosse incapaz de prover o crescimento de *S. cerevisiae*, uma pequena porção de D-xilose foi consumida e D-xilitol foi detectado no final do experimento, no meio em que D-glucose e D-xilose coexistiram. D-xilitol foi também detectado quando *S. cerevisiae* cresceu em D-xilulose.

O D-xilitol pôde ser detectado quando o substrato para *S. cerevisiae* foi D-xilose ou D-xilulose indicando que o caminho usado por *Candida utilis* para converter D-xilose a D-xilulose também existe em *S. cerevisiae*.

A razão do menor aproveitamento por *S. cerevisiae* de D-xilose para crescimento provavelmente é devida à baixa taxa de assimilação de D-xilose, indicada por CIRILLO (1968).

GONG *et alii* (1983) em trabalho sobre conversão de pentoses por leveduras, observaram que a maioria das linhagens do gênero *Saccharomyces* utilizou xilulose prontamente sob condições aeróbicas e fermentativas. Os produtos formados por leveduras do gênero *Saccharomyces*, a partir de D-xilulose são etanol, xilitol e D-arabitol. A quantidade e o tipo de produtos formados por este grupo de leveduras variam largamente dependendo da levedura e condições de incubação empregados. Assim D-arabitol é o principal produto de *S. cerevisiae* 26497 sob condições aeróbicas e fermentativas. A levedura *S. cerevisiae* 4132 produziu aproximadamente igual quantidade de xilitol e D-arabitol sob condições aeróbicas, mas produziu muito mais xilitol sob condições fermentativas.

Segundo os mesmos autores a produção de arabitol proveniente de D-xilulose ou D-xilose tem por precursor a ribulose-5 fosfato e ribulose-5 fosfato tem a capacidade de derivar de D-xilulose-5 fosfato por fosfocetopentosepimerase (D-xilulose-5 fosfato-3 epimerase).

2.4.2. Hidrolisados lignocelulósicos

Soluções de açúcar preparadas por hidrólise ácida de material lignocelulósico têm sido usadas em fermentação, em escala comercial, para produzir somente álcool etílico ou levedura forrageira, (HAJNY, 1981).

LEONARD & HAJNY (1945) listaram quatro fontes potenciais de substâncias tóxicas que podem ser encontradas

em hidrólizados lignocelulósicos: produtos da decomposição de carboidratos, produtos da decomposição da lignina, extrativos presentes na matéria-prima e produtos de corrosão de metal dos equipamentos, as quais afetam o rendimento da fermentação. Segundo os mesmos autores os rendimentos em álcool obtidos com *Torula utilis* são comparáveis aos obtidos com *Saccharomyces cerevisiae*, mas requerem um maior tempo de fermentação. Demonstraram ainda, trabalhando com *Saccharomyces cerevisiae*, que as dificuldades de fermentação podiam ser superadas com um tratamento prévio do hidrolisado como: aquecimento, adição de substâncias redutoras como sulfitos, ácido ascórbico, cisteína; destilação com vapor do hidrolisado e adição de uma elevada proporção de inóculo, chegando a obter 80% de fermentação em 10 horas.

A aclimação de levedura ao meio aumenta o rendimento em leveduras e a taxa de utilização de açúcar. (PETERSON *et alii*, 1945; JOHNSON & HARRIS, 1948 e HAJNY, 1981). Leveduras de diversos gêneros foram testadas para verificar sua habilidade em crescer em hidrolisados e sua facilidade de aclimação a esses meios. Os resultados obtidos por JOHNSON & HARRIS (1948) encontram-se na Tabela 3, para leveduras crescendo em hidrolisados com aproximadamente 5% de açúcar total.

SLININGER *et alii* (1982) observaram que a levedura *Pachysolen tannophilus* tem a capacidade de converter D-xilose a etanol. Em culturas em batelada, contendo 50 g/l de D-xilose e aeradas, concluíram que 11% da D-xilose foi

consumida para formar 4,4 g da biomassa produzida por litro de cultura significando que 29% da D-xilose foi usada para manutenção das células e ou formação de produtos metabólicos além de etanol e CO_2 .

Tabela 3 - Crescimento de várias culturas de levedura em hidrolisados lignocelulósicos durante 24 horas.

LINHAGEM	AÇÚCAR INICIAL UTILIZADO ¹ (%)		RENDIMENTO DE LEVEDURA ¹ (%)	
	1 ^a Transf.	12 ^a a 15 ^a Transf.	1 ^a Transf.	12 ^a Transf.
<i>Torula utilis major</i>	78	82	25	42
<i>Torula utilis thermophilis</i>	78	80	33	38
<i>Torula utilis</i> n ^o 2	78	82	25	38
<i>Torula utilis</i> n ^o 900	47	79	20	38
<i>Torula utilis</i> n ^o 3	50	88	22	37
<i>Torula utilis</i> n ^o 660	80	83	32	35
<i>Torula utilis</i> n ^o 793	80	85	31	38
<i>Torula utilis</i> n ^o 957	80	82	30	37
<i>Candida albicans</i>	81	94	32	41
<i>Candida arborae</i>	45	86	21	35
<i>Candida arborae</i> n ^o 197	30	83	15	37
<i>Candida arborae</i> n ^o 198	25	84	12	37
<i>Mycotorula lipolytica</i>	10	84	5	36
<i>Hansenula anomala</i>	50	80	21	33
<i>Hansenula suaveolens</i>	25	82	11	34
<i>Saccharomyces ananensis</i>	75	84	30	36
<i>Sac. cerevisiae</i> n ^o 46	50	83	22	30
<i>Saccharomyces ellipsoideus</i>	60	80	27	35
Best yeast n ^o 2	33	80	15	38

Fonte: JOHNSON & HARRIS, (1948).

¹Baseada no açúcar total em solução.

Tratamentos pelo calor foram testados a diferentes concentrações hidrogeniônicas por PETERSON *et alii* (1945). As propriedades do meio resultante não foram significativamente diferentes. Houve apreciável destruição de açúcares redutores, quando o aquecimento foi realizado às mais baixas concentrações hidrogeniônicas (pH 8-10). Para ajustar o pH do licor foram usados, pelos mesmos autores, hidróxido de amônia que serve para elevar o pH e como fonte de nitrogênio; carbonato de cálcio, o qual apresenta a desvantagem de causar espuma excessiva e hidróxido de cálcio o qual evita formação de espuma, é de fácil manuseio mas o pH precisa ser observado. Com pH acima de 7,0 e subsequente aquecimento, causou destruição de açúcares e aumento da toxicidade do meio.

Segundo LEONARD & HAJNY (1945), hidróxido de bário e hidróxido de sódio foram de igual qualidade para neutralização e tratamento alcalino dos hidrolisados. O aquecimento de soluções neutras, surtiu o mesmo efeito que a adição de agentes redutores, isto é, aumentou a taxa de fermentação.

Em hidrolisados lignocelulósicos o mais baixo pH no qual a levedura cresce satisfatoriamente é pH 4,0. À medida que se eleva o pH, o crescimento da levedura torna-se mais rápido e aumenta a utilização de açúcar, embora a levedura se torne progressivamente mais escura (HAJNY, 1981).

Segundo PETERSON *et alii* (1945) as melhores condições para uma fermentação aeróbica em hidrolisados são

pH-4,5-5,5; temperatura 25°-35°C, tempo de fermentação: 16 horas para um hidrolisado com 1% de AT a temperatura de 30°C; aeração 2 a 4 volumes por minuto; alimentação do mosto, 0,5-1% de AT e adição de nutrientes mantendo o nível acima de 0,3% de AT.

HARRIS *et alii* (1948), trabalhando com levedura *Torula* em hidrolisados lignocelulósicos para obtenção de proteína unicelular, verificaram que ao mesmo tempo em que a levedura consumia os açúcares, também consumia os ácidos orgânicos da solução, sendo necessário adicionar ácido sulfúrico para manter o pH entre 5,0 e 5,5. Os mesmos autores (1948) observaram em testes de soluções remanescentes redutoras de hidrolisados que após 75% do material redutor ter sido utilizados por leveduras, não havia açúcares presentes que respondessem a um teste de osazona, concluindo que 25% das propriedades redutoras destas soluções são devidas a não-açúcares.

Foram testados, para levedura crescendo em hidrolisados, várias fontes de nitrogênio: amônia, fosfato ácido diamônia, sulfato de amônia e uréia. O composto que apresentou melhor rendimento em levedura, segundo PETERSON *et alii* (1945) foi uréia ao nível de 0,06 g por grama de açúcar. Como fontes de fósforo, foram testados fosfato dibásico de potássio, fosfato monobásico de potássio, fosfato diamônio e superfosfato. Os melhores resultados, segundo os mesmos autores, foram com fosfato monobásico de potássio ao nível de 0,05 g de fosfato monobásico por grama de açúcar redutor.

STAMFORD (1979) trabalhou com *Aspergillus niger* crescendo em licor obtido de bagaço de cana, com e sem tratamento para eliminação de furfural. Com substituição pura e simples do meio sintético por licor tratado, houve 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. A produção máxima de biomassa foi obtida quando se usou 100% de licor tratado em substituição ao meio sintético, na condição nutricional com balanceamento de carbono e nutrientes e pH ajustado para 5,0. RAMOS *et alii* (1979) estudaram a levedura *Candida utilis* Y-900 crescendo em meio obtido por hidrólise ácida de bagaço contendo 8% de açúcares redutores, principalmente xilose e arabinose. Foi feita contagem de células e foi observada a densidade ótica da cultura com e sem adição de extrato de levedura. A velocidade máxima de crescimento específico foi 0,38/h; 75% dos açúcares foram consumidos em 34 horas e o conteúdo proteico da biomassa foi de 43%.

RAMOS (1983) estudou a influência do pH e de algumas bases na fermentação de soluções obtidas por hidrólise de bagaço com ácido sulfúrico. Estas soluções foram parcialmente ou completamente neutralizadas com hidróxido de cálcio, hidróxido de sódio ou hidróxido de amônio para vários valores de pH. *Candida pseudotropicalis* cresceu em meio de cultura baseado nessas soluções. Quando hidróxido de cálcio, hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio, foram usados, o pH aumentou durante a fermentação; pH inicial

maior que 5,0 deu máxima produção de biomassa em média cerca de 5 g de matéria seca por litro. Tratamento com hidróxido de amônio dirigiu a um pH decrescente durante a fermentação e baixo rendimento de biomassa.

Um estudo sobre melhoramento de produção de leveduras provenientes de xarope hidrolítico a fim de avaliar sua qualidade nutricional foi feito por RAMOS *et alii* (1983), utilizando *Candida pseudotropicalis*. O meio de cultura baseado em hidrolisado ácido de bagaço foi neutralizado com hidróxido de cálcio. Em um processo de semibatelada, a taxa de crescimento específico foi de 0,22/h e 42% de rendimento sobre os açúcares redutores consumidos. O conteúdo protéico encontrado na biomassa foi de 42% e 10% de cinzas. Seu valor nutricional foi comparado com o da levedura *Torula* em testes com ratos; os resultados mostraram que a levedura *Candida* poderia substituir a levedura *Torula*.

2.5. Levedura

2.5.1. Considerações Gerais

Os microrganismos, algas, bactérias, fungos e leveduras, são fontes de proteína unicelular, que podem ser utilizadas na alimentação humana e animal. São os chamados alimentos não convencionais.

O interesse dos pesquisadores em incluírem os microrganismos na ração animal deve-se ao seu elevado teor protéico, vitamínico e baixo custo.

As vantagens dos microrganismos sobre plantas e animais como produtores de proteína, segundo KILBERG (1972) são: possuem um tempo de geração muito curto, por exemplo, as leveduras dobram sua massa num intervalo de tempo de 1-3 horas; podem ser modificados geneticamente com o objetivo de desenvolver uma qualidade requerida, por exemplo a habilidade de crescer a temperaturas mais altas; o conteúdo protéico dos microrganismos é alto; os substratos para a produção dos microrganismos podem ser os localmente disponíveis como resíduos líquidos de processamento de frutas, soro de leite, melaço, hidrolisados de celulose e outros; em culturas contínuas, independente de clima, com pouca disponibilidade de espaço e água.

As leveduras podem ser obtidas por inoculação em substratos como melaço, vinhaça, licores sulfíticos e outros, em condições adequadas com o objetivo único de se produzir massa celular ou serem obtidas como um subproduto de fermentação. Segundo DESMONTS (1966a) as destilarias de álcool podem produzir os dois tipos de levedura para alimentação humana ou animal: a levedura do gênero *Saccharomyces*, recuperada sobre os vinhos da fermentação alcoólica (levedura de recuperação) e a do gênero *Torula* cultivada em vinhaça, em instalações anexas à destilaria (levedura de cultivo). As leveduras do gênero *Saccharomyces*, devido às suas condições de recuperação, segundo o mesmo autor, não permitem, na maioria dos casos o seu uso direto na alimentação humana.

No processo de produção de álcool etílico, as leveduras de recuperação podem ser obtidas de três maneiras: desvio de parte do leite de levedura, centrifugação da vinhaça e aproveitamento do fundo de dornas (D'ARCE & MACHADO, 1985 e DE MARTIN, 1987).

De acordo com esses mesmos autores, o produto obtido do fundo de dornas é de qualidade inferior àquele obtido do desvio de leite de levedura, principalmente devido à alta concentração de minerais e impurezas (bagacilho, terra, areia, etc) e também, à grande variação na sua composição química. A qualidade da levedura de recuperação, por quaisquer das fontes obtidas pode ser melhorada através de lavagens da levedura com água, o que elimina impurezas, mas podendo causar perdas significativas do material original.

A levedura de recuperação, segundo D'ARCE & MACHADO (1985) pode ser fornecida como suplemento de rações de animais domésticos, no estado "*in natura*" ou desidratada. No primeiro caso, ela precisa ser fresca porque sofre um processo de deterioração relativamente rápido. A levedura desidratada facilita o transporte, manuseio e possibilita o armazenamento por períodos longos.

Recentemente, muitos ensaios tem sido realizados com levedura de recuperação a fim de avaliar sua qualidade nutricional para bovinos, suínos e aves.

2.5.2. Composição química da levedura

Vários fatores podem afetar a composição química das leveduras, como natureza do substrato, linhagem, condições de propagação (SALES *et alii*, 1977) e os tratamentos pós-fermentação (DESMONTS, 1966a). A natureza do meio de crescimento e o grau de aeração, são os principais fatores que influenciam o conteúdo de carboidratos, proteínas, gorduras e vitaminas (PEPPLER, 1970).

FREY (1930), relata para levedura de panificação a seguinte composição: 52,4% de proteína, 37,1% de polissacarídeos, 1,7% de gordura e 8,8% de cinzas.

Segundo WHITE (1954) as leveduras são constituídas de aproximadamente 44,67%, de proteínas, ácidos nucleicos e bases orgânicas (purina e pirimidina) na matéria seca; 1-2,2% de fração lipossolúvel: gorduras verdadeiras, esteróides (ergosterol), lipóides (lecitina); 6-8% de substâncias inorgânicas, encontradas nas cinzas; 1-30% de glicogênio; celulose acima de 5%; mananas acima de 4% e pequenas quantidades de vitaminas, especialmente do grupo B, também estão presentes.

HARRISON (1971) apresenta a composição elementar de leveduras, (Tabela 4), com intervalos para as proporções dos elementos (C, O, N, H, etc.) encontrados em leveduras comerciais, incluindo levedura de panificação, cervejaria, levedura para alimento humano e animal, como mostra intervalos típicos para os elementos em melaço de cana-de-

-açúcar e beterraba, como matéria-prima comum obtidas de fonte botânica.

Tabela 4 - Composição elementar de leveduras comerciais e melaço.

ELEMENTOS	LEVEDURA	MELAÇO
	(g/100g matéria seca)	(g/100g matéria seca)
C	45-47	39-41
H	6,0-6,5	6,3-6,8
O	31-32	47-50
N	7,5-9,0	0,1-2,8
K	0,9-3,5	0,8-5,2
P	1,1-2,0	0,01-0,9
S	0,3-0,5	0,15-0,2
Mg	0,15-0,5	0,007-0,75
Ca	0,04-0,9	0,018-1,2
Na	0,02-0,2	0,82-1,4
Zn	0,004-0,13	0,0006-0,013
Fe	0,003-0,1	0,01-0,021
Cu	0,002-0,012	0,0001-0,006
Mn	0,0004-0,0035	0,001-0,004
Co	0,0005	0,00004-0,0001
Mo	0,000005-0,000009	0,000009-0,000028
Cl	0,004-0,1	1,3
I	0,00005-0,0004	-
Pb	0,0001-0,0007	0,0006
As	0,00001	-
Si	-	0,028
Sr	-	0,005
B	-	0,0002-0,0004

Fonte: HARRISON, (1971).

PEPPLER (1970) relata que metade do peso seco das leveduras é proteína bruta ($N \times 6,25$) com 80% de aminoácidos, 12% de ácidos nucleicos e 8% de amônia; cerca de 7% do nitrogênio total ocorre na forma de aminoácidos livres. A presença de grande quantidade de purinas e pirimidinas (constituintes dos ácidos nucleicos) baixa o teor de proteínas para 40% de proteína verdadeira sobre o peso seco da levedura. O nitrogênio ocorre em menor quantidade nos constituintes: glutatona, lecitina, ácido adelínico, vitaminas e enzimas.

As proteínas de leveduras são bem balanceadas em aminoácidos quando comparadas com as proteínas do ovo, mas apresentam deficiência em aminoácidos sulfurados (KILBERG, 1972 e VANANUVAT & KINSELLA, 1975). As leveduras são deficientes em metionina, porém possuem alto teor em lisina, aminoácido que em trigo e na maioria dos cereais é muito baixo; por esse motivo a levedura é indicada para suplementação de dietas à base de cereais (DESMONTS, 1966b; PEPPLER, 1970; KILBERG, 1972; FLANNERY, 1975; VANANUVAT & KINSELLA, 1975 e SALES *et alii* 1977). Quando a levedura é suplementada com metionina a eficiência de utilização protéica chega bem perto daquela da caseína (PEPPLER, 1970 e SALES *et alii*, 1977).

A Tabela 5, mostra a composição em aminoácidos essenciais de algumas leveduras comerciais (PEPPLER, 1970).

Tabela 5 - Composição em aminoácidos essenciais de leveduras alimentares comerciais.

AMINOÁCIDO	TEOR NA LEVEDURA (g/16g N)		
	A	B	C
Lisina	8,2	6,7	9,7
Valina	5,5	6,3	5,9
Leucina	7,9	7,0	7,7
Isoleucina	5,5	5,3	7,3
Treonina	4,8	5,5	7,0
Metionina	2,5	1,2	3,5
Fenililalanina	4,5	4,3	5,6
Triptofano	1,2	1,2	1,7
Cistina	1,6	0,7	1,2
Histidina	4,0	1,9	3,6
Tirosina	5,0	3,3	4,5
Arginina	5,0	5,4	4,3

Fonte: PEPPLER, (1970).

A - *Saccharomyces cerevisiae* de melaço.

B - *Candida utilis* de licor sulfítico.

C - Levedura de panificação.

A levedura é uma das fontes mais ricas em vitaminas do complexo B (LIMA, 1966; PEPPLER, 1970; KILBERG, 1972 e SALES, *et alii* 1977). As vitaminas do complexo B, com altos teores de niacina e riboflavina (HSU, 1961) ocorrem em leveduras principalmente como componentes de enzimas e coenzimas (PEPPLER, 1970).

Segundo LIMA (1966), o teor de cinzas é relativamente alto em leveduras, dependendo da espécie, raça e das condições de cultivo, devendo-se ainda considerar a possibilidade de uma impurificação mineral extracelular, no caso de leveduras forrageiras a partir de rejeitos ricos em suspensão coloidal, como ocorre nas vinhaças de destilarias e mostos de melaço de cana.

As leveduras comerciais apresentam 6-8% de cinzas sobre a matéria seca. A maioria das cinzas é constituída por potássio e fósforo, com menor quantidade de cálcio, magnésio e enxofre (PEPPLER, 1970).

DESMONTS (1966b) relata que a relação P/Ca em levedura é elevada, porém MIYADA & LAVORENTI (1979) e FIALHO *et alii* (1983) trabalhando com levedura *Saccharomyces cerevisiae* de destilaria de álcool de cana-de-açúcar obtiveram respectivamente a relação Ca/P de 1,98 e 1,78, consideradas adequadas para alimentação de suínos.

Os carboidratos constituem 22-34% do peso seco das leveduras com aproximadamente 32% de trealose, 27% de glucanas, 21% de mananas e 12% de glicogênio. As mananas e glucanas são maiores componentes das paredes da célula de levedura, associadas com proteínas e lipídeos (PEPPLER, 1970).

O teor em lipídeos nas leveduras está ao redor de 2% (HSU, 1961). Quando num meio de crescimento fortemente aerado existe quantidade de fósforo, com escassez de nitrogênio, para limitar produção de proteína, o teor em

lipídeos se eleva na levedura (HSU, 1961; PYKE, 1964 e KILBERG, 1972), podendo chegar a 60% do peso seco da levedura para "fat yeasts" (HSU, 1961 e KILBERG, 1972), adquirindo cor marrom (HSU, 1961).

Os principais componentes dos lipídeos de leveduras são: triglicerídeos, lecitina e ergosterol. Há predominância dos triglicerídeos dos ácidos oléico e palmítico (PEPPLER, 1970 e HSU, 1961). O teor em ergosterol é extremamente baixo em torno de 0,1%, exceto para o gênero *Saccharomyces*, que segundo DULANEY, *et alii* (1954) em um experimento com melaço e infusão de milho, para verificar a habilidade de sessenta espécies de leveduras em produzir ergosterol encontrou rendimentos de 7-10% de ergosterol para *Saccharomyces cerevisiae*. O ergosterol tem importância na composição da levedura pelo fato de se converter em calciferol (vitamina D_2), por irradiação com raios ultravioletas (HSU, 1961 e PEPPLER, 1970).

2.5.3. Valor nutritivo da levedura

Até o presente momento somente leveduras obtidas a partir de hidratos de carbono tem sido usadas na alimentação humana, no preparo de produtos dietéticos, sopas, biscoitos, produtos de carne, etc (SALES *et alii*, 1977). Pelas suas propriedades físicas e químicas, as leveduras são usadas como aditivos de alimentos. Como um agente antioxidante, a levedura é utilizada na preservação

de alimentos, como por exemplo em cremes. A levedura em pó adicionada a pães e bolos preserva a umidade dos produtos permanecendo frescos por mais tempo. Em bolachas, quando adicionada, melhora a fragância e fragilidade (HSU, 1961).

As leveduras como um alimento rico em proteínas, com elevado teor de lisina, triptofano e vitaminas (PEPPLER, 1970) tem sido recomendadas para enriquecimento de rações à base de cereais (LIMA, 1966).

MATTOS *et alii* (1983) realizaram um ensaio biológico com ratos para avaliar a qualidade da proteína de levedura. Os ratos foram alimentados com levedura seca obtida de fundo de dorna de fermentação alcoólica, em dietas isoprotéicas e isocalóricas, com níveis de substituição da caseína por levedura iguais a 0; 50 e 100%, nos tratamentos A, B e C. (A = 100% caseína, B = 50% caseína e 50% levedura seca, C = 100% levedura). Os resultados para taxa de eficiência protéica para proteína bruta foram: 0,71; 0,59; 0,47 e para proteína verdadeira: 0,71; 0,73; 0,74. A taxa de eficiência protéica para proteína verdadeira não foi diferente nos três tratamentos. Os resultados parecem indicar, segundo os autores, que o menor desempenho dos animais que receberam o tratamento C, pode ser devido aos teores elevados de nitrogênio não protéico da levedura quando comparados com a caseína.

O maior número de pesquisas com a levedura seca de destilarias de álcool tem sido desenvolvido com suínos. MIYADA (1978), estudou o efeito da adição de vários

níveis de levedura seca obtida de destilaria de álcool de cana-de-açúcar em rações de suínos em crescimento e acabamento sobre o desempenho e qualidade da carcaça dos animais. A qualidade da carcaça foi melhorada com a elevação dos níveis da levedura seca, pois além de uma tendência em diminuir a espessura do toicinho, houve uma redução linear da relação gordura/carne e um aumento linear da percentagem de pernil. Os resultados indicaram a possibilidade de uso da levedura seca como fonte de proteínas para suínos em crescimento e acabamento, pelo menos até o nível de 21% da ração. LIMA (1983), usando os mesmos níveis de levedura seca (0; 7; 14; 21 %) em substituição ao milho e farelo de soja na alimentação de matrizes suínas em gestação e lactação, concluiu que existe a possibilidade do emprego de levedura seca como fonte de proteínas para as matrizes suínas, pelo menos até o nível de 21%.

De acordo com BERTO (1985), o uso de levedura seca até o nível de 45% de substituição à proteína do milho e farelo de soja nas rações de leitões em recria é possível e está na dependência da disponibilidade e do custo do produto.

MIYADA (1978) e BERTO (1985) observaram um maior consumo diário de ração e uma pior conversão alimentar (consumo de ração/ganho de peso) dos animais com o aumento da levedura seca na ração. A hipótese levantada é de que tais resultados tinham sido uma consequência do baixo nível energético das rações contendo a levedura (MIYADA, 1978;

MIYADA & LAVORENTI, 1979 e BERTO, 1985). MOREIRA (1984), trabalhando com o mesmo tipo de levedura, mas com rações isocalóricas, não encontrou diferenças estatísticas significativas no desempenho de suínos em crescimento e terminação.

KRONKA *et alii* (1987) em experimento com suínos verificaram os efeitos da levedura seca e do farelo de arroz no desempenho e características de carcaças de suínos, concluindo que o farelo de arroz e a levedura seca podem, substituir em 25% as fontes energéticas e protéicas, respectivamente.

MACHADO, (1983) substituindo o farelo de algodão do concentrado por levedura seca, obtida do desvio de parte de leite de levedura, em experimento com vacas da raça Holandesa em início de lactação concluiu que a substituição de 100% do farelo de algodão por levedura seca resultou em maior eficiência digestiva, maior produção de proteína do leite, sem efeitos adverso na composição do leite e nos parâmetros sanguíneos. A proteína do farelo de algodão pode ser substituída pela proteína da levedura, em dietas de ruminantes, com vantagens (MACHADO *et alii*, 1983).

Segundo MATTOS *et alii* (1987); os resultados com vacas em lactação ulceradas sugerem que a levedura é um substrato adequado para manter a fermentação no rumen proporcionando um aumento de microrganismos e alguns metabólitos importantes para a síntese do leite.

CAMPOS NETO *et alii* (1987) desenvolveram um trabalho com cabras leiteiras a fim de avaliar o valor alimentar do bagaço de cana hidrolisado e da levedura seca na produção de leite. Os autores concluíram que o bagaço de cana hidrolisado e a levedura seca poderão ser utilizados na alimentação suplementar de caprinos, principalmente no período seco.

WALDROUP & HAZEN (1975) em experimento utilizando 0; 2,5; 5; 10 e 15% de levedura em adição a rações de mistura de farelo de milho e farelo de soja, isoprotéicas e isocalóricas, verificaram que a produção de ovos e o desempenho da aves não foram prejudicadas pela inclusão da levedura nos níveis citados, indicando que a levedura desenvolvida em alcanos de alta pureza é adequada para uso em dietas nutricionalmente balanceadas para aves poedeiras.

MOURA *et alii* (1982) observaram que em rações para frangos de corte constituídas por farinha de peixe, farelo de soja e carne, a substituição da farinha de peixe pela levedura *Saccharomyces cerevisiae* de álcool de cana-de-açúcar, praticamente não afetou o desenvolvimento dos animais, o mesmo não ocorrendo com a substituição da carne, assim como da carne e do peixe concomitantemente.

PEZZATO *et alii* (1982) conduziram um experimento com dietas isocalóricas e isoprotéicas de milho mais soja com suplementos vitamínicos e minerais para frangos de corte, com substituição do milho mais soja por 0; 10; 20 e 30% de levedura seca. O melhor desempenho das aves verifi-

cou-se com a inclusão de 10% de levedura seca. Os autores concluíram que até níveis de 20% da levedura em rações para aves a adição de levedura constituiu-se numa excelente alternativa economizadora de milho e soja para rações de frango de corte.

TAMBURO *et alii* (1982) em trabalho realizado com frangos de corte e nas mesmas condições do experimento anterior, observaram que à medida que se eleva o teor de levedura seca obtida durante a fabricação de álcool de cana-de-açúcar na ração, há um incremento de umidade das excretas.

PEZZATO (1985) concluiu dos trabalhos realizados com levedura cultivada em melaço de cana-de-açúcar, na alimentação de aves, que os níveis mais promissores de substituição de soja e milho pela levedura foram na faixa de 10-15% da ração e que em níveis superiores as fezes das aves tornam-se pegajosas.

2.5.4. Efeito tóxico da levedura

Devido ao elevado teor de ácidos nucleicos em leveduras, 6-8% em *Saccharomyces cerevisiae*, 5,5% para *Torula* (VILLALÓN & TAGLE, 1973) muitos pesquisadores têm se preocupado com os possíveis efeitos deletérios dos produtos de degradação das purinas e pirimidinas, bases nitrogenadas provenientes dos ácidos nucleicos. As pirimidinas se degradam sucessivamente até acetil-S-CoA e succinil-S-CoA.

Parte do nitrogênio das pirimidinas é excretada na urina na forma de β -alanina, carbanil- β -alanina e ácido β -aminoisobutírico (SLAGLE & ZIMMERMAN, 1979) e provavelmente na forma de amônia.

O maior problema poderá surgir do metabolismo das purinas, que no homem o produto final é o ácido úrico. Segundo KILBERG (1972), o homem ingerindo alta quantidade de ácidos nucleicos na dieta fica sujeito a alta concentração de ácido úrico no plasma e aumento de excreção de ácido úrico na urina, proveniente da degradação das purinas. Sendo o ácido úrico pouco solúvel, um aumento de sua concentração no plasma pode resultar em precipitação de uratos nos tecidos e nas articulações. Algumas pedras podem ser formadas nos rins e bexiga.

Nas aves, no homem, nos macacos superiores, no cão dalmaciano, a degradação das purinas (adenina e guanina) termina na etapa do ácido úrico. Nos demais mamíferos o catabolismo das purinas prossegue até alantoina por ação da enzima uricase (KILBERG, 1972 e PEZZATO, 1985). Os suínos tem a capacidade de metabolizar o ácido úrico em alantoina (SLAGLE & ZIMMERMAN, 1979 e PEZZATO, 1985) por ação da uricase, mas por deficiência de guanase, os produtos finais do metabolismo das purinas são a guanina e a alantoina, não depositando ácido úrico (uratos) nas articulações mas podendo apresentar "gota" em consequência de deposições de guanina nas mesmas regiões do corpo (PEZZATO, 1985).

MATTOS *et alii* (1983) não constatarem alterações no fígado, rins, baço e intestinos de ratos alimentados com levedura seca obtida de fundo de dorna, quando este produto substituiu a caseína na ração aos níveis de 0; 50 e 100% da proteína bruta.

MENTEM *et alii* (1984) em estudos realizados com porcas em gestação e lactação, alimentadas com levedura seca, observaram uma variação inconsistente nos níveis de ácido úrico no sangue, indicando que as purinas ou não foram absorvidas ou, em caso positivo foram metabolizadas a outro produto, não havendo acúmulo de ácido úrico no sangue.

PEZZATO (1985) concluiu que até o nível de substituição de 10-15% de soja ou milho por levedura seca, na ração de aves, não afeta a consistência das fezes das mesmas.

FAZANO (1986) com objetivo de avaliar a qualidade da proteína de levedura seca obtida durante a fabricação de álcool de cana-de-açúcar, comparada com o farelo de soja em alimentação de coelhos em crescimento, aos níveis de 8 e 12% de proteína total, não observou qualquer anormalidade nos animais submetidos a esses tratamentos.

De acordo com MATTOS *et alii* (1987) a administração de leveduras para vacas em lactação em quantidades até 4 kg/dia não causou efeitos patológicos ou alteração fisiológica a esses animais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Matéria-Prima

A matéria-prima utilizada neste trabalho foi bagaço de cana-de-açúcar, coletado na Usina Modelo - Piracicaba - SP, não tendo sido possível detectar a variedade de cana-de-açúcar.

3.2. Substrato para Fermentação

No mesmo dia da coleta de bagaço, foram preparados o extrato e o licor de bagaço nos laboratórios do Departamento de Tecnologia Rural e do Departamento de Ciências Florestais, da ESALQ.

3.2.1. Extrato de bagaço

Procedeu-se à extração do caldo residual do bagaço pelo método do digestor a frio, de acordo com COOPERATIVA DOS PRODUTORES DE CANA, AÇÚCAR E ÁLCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO LTDA, COPERSUCAR, (1978).

3.2.2. Licor de bagaço

O licor de bagaço de cana-de-açúcar foi obtido através de autoclavagem do bagaço úmido misturado com água na proporção de 1:10 (Peso seco/volume) à temperatura de 170°C por 30 minutos, em um digestor rotativo com capacidade para 20 litros, segundo STAMFORD (1979).

3.3. Determinações Analíticas

- Umidade % bagaço, segundo PAYNE (1968);
- Brix do extrato e do licor por refratometria, segundo PAYNE (1968);
- Açúcar total do extrato e do licor e açúcar residual no vinho delevurado foram determinados pelo método de Somogyi e Nelson, descritos por PASSOS *et alii* (1960), com prévia inversão da sacarose do extrato, descrito por AMORIM *et alii* (1979) modificado. Açúcar residual, com prévia desproteínização das amostras, segundo VILLELA *et alii* (1973);
- pH: Determinado por potenciometria;
- Nitrogênio: Pelo método Micro-Kjeldahl, descrito por MEEKER & WAGNER (1933);
- Fósforo: Pelo método de GOMORI (1942);
- Cálcio e magnésio: Pelo método complexométrico do EDTA, descrito por OLIVEIRA *et alii* (1974);
- Potássio: Por fotometria de chama, segundo GLÓRIA & SANTA ANA (1975);

A composição do extrato e do licor em unidade % bagaço, Brix, açúcares totais (AT), AT% bagaço e o pH do extrato e do licor são apresentados na Tabela 6. A composição do extrato e do licor em N, P, K, Ca e Mg, na Tabela 7.

- Acidez: A acidez, expressa em ácido acético, do extrato do digestor, do licor e do vinho delevurado foi determinada através de titulação com uma solução de hidróxido de sódio 0,02N em potenciômetro até pH 7,0;
- Açúcares do licor: No licor de bagaço foi realizada análise dos açúcares residuais mais os provenientes da pré-hidrólise do bagaço por cromatografia líquida de alta pressão (HPCL). A composição do licor nos açúcares hidrolisados se encontram na Tabela 8;
- Furfural: Por HPCL. Para eliminação de furfural, um inibidor de fermentação, o licor foi neutralizado com uma solução de hidróxido de sódio 1N e a seguir evaporado até seu volume se reduzir à metade. Em seguida foi adicionada água destilada ao licor evaporado, voltando ao seu volume inicial (STAMFORD, 1979). O teor de furfural existente na amostra de licor original era 315 ppm e 36 ppm no licor tratado;
- Etanol: 1. Determinação por densimetria, segundo AMORIN *et alii* 1979), realizada no final de todos os ensaios de fermentação; 2. Determinação pelo método de

oxidação do etanol pelo dicromato de potássio (JOSLYN, 1970), modificado por HORII & STUPIELLO (1970); método utilizado no Ensaio IV, para acompanhamento cinético da produção de etanol;

- Massa seca de células: 1. Para inóculo. Pesagem de três amostras de uma grama de fermento prensado, secagem em estufa a 105°C até peso constante (10-16h), segundo HARRISON (1971). 2. Após fermentação. O sedimento da centrifugação era suspenso em água destilada e novamente centrifugado, desprezando-se o sobrenadante. A seguir, era filtrado em membrana "millipore", com diâmetro de poro igual a 1,2 μ , conforme descrito por BUENO NETTO (1982) e a massa seca de células era obtida após secagem a 105°C até peso constante (HARRISON, 1971);

Tabela 6 - Umidade % bagaço, Brix, pH, açúcar total (AT) e AT% bagaço do extrato do digestor e do licor.

ELEMENTOS	EXTRATO	LICOR
Brix	0,50	3,00
pH	4,00	5,30
AT (mg/100 ml)	310,00	1720
AT (% bagaço)	3,26	7,79
Umidade % bagaço	52,44	

Tabela 7 - Teores de nutrientes minerais no extrato e no licor de bagaço.

ELEMENTOS	EXTRATO (ppm)	LICOR (ppm)
N	19,36	79,80
P	3,41	20,05
K	62,50	177,50
Ca	49,28	140,80
Mg	-	-

Tabela 8 - Açúcares do licor de bagaço.

AÇÚCARES	TEOR %
	ANTES DA FERMENTAÇÃO
melibiose	0,05
glucose	0,17
xilose	0,31
xilitol	-
arabinose	0,09
outros sacarídeos	< 0,04

3.4. Inóculo

O microrganismo utilizado em todos os ensaios foi *Saccharomyces cerevisiae*, conhecido como levedura de panificação, obtido na forma de fermento prensado comercial.

A quantidade de fermento utilizada na fermentação foi de uma grama de fermento para cada 100 ml de substrato.

O preparo do inóculo consistia na diluição de uma grama de fermento prensado em 10 ml de água destilada, o qual era transferido ao frasco de Erlenmeyer usado na fermentação, adicionando-se mais 10 ml de água destilada, utilizados na lavagem do béquer.

3.5. Suplementação de Sais dos Substratos

A quantidade dos nutrientes foi calculada a partir da composição elementar de leveduras e rendimento em leveduras por 100g de glucose (HARRISON, 1971), considerando a composição do extrato e do licor em açúcares e minerais.

Os meios foram suplementados com:

Para Licor:

- 786 ppm de N na forma de uréia;
- 172 ppm de P na forma de fosfato monobásico de potássio.

Para Extrato:

- 131 ppm de N na forma de uréia;
- 30 ppm de P na forma de fosfato monobásico de potássio.

3.6. Descrição dos Equipamentos

As fermentações foram realizadas em frascos de Erlenmeyer de 500 ml. Esses fermentadores eram colocados em banho-maria dotado de agitador com temperatura controlada e sob agitação de 200-220 movimentos por minuto.

Através de trompa de vácuo o ar atmosférico borbulhava em um frasco de Erlenmeyer com ácido sulfúrico e em seguida passava por água destilada em outro frasco, para evitar que o ácido sulfúrico fosse arrastado pelo ar aos frascos de Erlenmeyer seguintes de fermentação.

Os frascos de Erlenmeyer foram tamponados com rolhas de borracha com duas perfurações onde foram adaptados dois tubos de vidro, um que mergulhava no substrato e outro situado acima do nível do substrato que retirava o ar, através de vácuo, levando-o para o fermentador seguinte.

3.7. Descrição de um Ensaio Típico

Os frascos de Erlenmeyer usados na fermentação com 100 ml de substrato juntamente com as rolhas de borracha e conexões eram esterilizados a 120°C , 1,0 atmosfera de pressão, por 10 minutos. Após esse tratamento o inóculo era introduzido nos frascos e homogeneizados. Aos substratos líquido eram adicionadas 3 gotas de octanol como antiespumante.

Os frascos eram colocados em banho maria, à temperatura de 35°C , agitados e interligados para efeito de aeração dos substratos. Com a introdução de ar e agitação dos frascos marcava-se o início da fermentação.

Após 24 horas os frascos eram retirados do agitador e procedia-se à medida do volume final do vinho e às análises pós-fermentação esquematizadas na Figura 2.

Figura 2 - Esquema das análises realizadas em um ensaio típico.

Antes de cada fermentação era medido o pH e feitas determinações de acidez, expressa em ácido acético, do extrato e do licor.

Terminado o período de fermentação (24 horas) e medido o volume do vinho, este era centrifugado a 3000 rpm (800 g) por 10 min, obtendo-se dois produtos: sobrenadante e sedimento.

No sobrenadante ou vinho delevurado, eram determinados pH e acidez, expressa em ácido acético, açúcares residuais e etanol. No sedimento da centrifugação do vinho era determinada massa seca de células conforme descrito em determinações analíticas.

Cada ensaio era constituído de três repetições para licor e três repetições para extrato.

3.8. Variação do Ensaio Típico

Foram realizados nove ensaios de fermentação. O primeiro ensaio foi realizado sem aeração e os oito restantes com aeração.

A medida do etanol no Ensaio 4 foi feita pelo método de oxidação do etanol pelo dicromato de potássio a cada quatro horas e no final da fermentação.

A partir do Ensaio 5 foi aumentada a aeração e os frascos de fermentação não mais se interligavam.

A partir do Ensaio 6 foi feita a suplementação de sais dos substratos com uréia e fosfato monobásico de potássio.

3.9. Cálculo dos Rendimentos

3.9.1. Rendimento do substrato (η_s)

O rendimento em células de leveduras em relação ao substrato expressa a massa de levedura produzida por 100 miligramas de açúcar total do substrato.

$$\eta_s = \frac{M_x}{1720} \times 100 \text{ (licor)}$$

$$\eta_s = \frac{M_x}{310} \times 100 \text{ (extrato)}$$

3.9.2. Rendimento biológico (η)

Convencionou-se chamar Rendimento biológico, a massa celular produzida por 100 miligramas de açúcar total consumidos durante a fermentação.

$$\eta = \frac{M_x}{A_c} \times 100$$

3.10. Cálculo das Eficiências

3.10.1. Eficiência do processo biológico (ε)

100 mg AT $\longrightarrow$ 47,5 mg massa seca de células

$A_c \longrightarrow x$

onde:

x = massa seca de células esperada.

$$x = \frac{47,5 \times A_c}{100}$$

$$0,475 A_c \rightarrow 100\% \text{ Eficiência}$$

$$M_x \rightarrow \varepsilon$$

$$\varepsilon = \frac{M_x}{0,475 A_c} \times 100$$

3.10.2. Eficiência do processo em relação ao açúcar total do substrato (ε_s)

$$\varepsilon_s = \frac{M_x}{147} \times 100 \text{ (extrato)}$$

$$\varepsilon_s = \frac{M_x}{817} \times 100 \text{ (licor)}$$

3.11. Cálculo da Razão de Crescimento Celular (R_x)

$$R_x = \frac{M_x}{M_{x0}} \times 100$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Pré-Hidrólise

Pela metodologia empregada do digestor a frio para obtenção do extrato de bagaço, obteve-se um substrato com 0,31% de açúcar total (AT). Esses açúcares representam os açúcares do caldo residual da cana-de-açúcar processada.

No preparo do licor pela autoclavagem do bagaço úmido, obteve-se no licor 1,72% de açúcar total, correspondentes aos açúcares residuais do bagaço mais os açúcares hidrolisados (Tabelas 6 e 8). Como as diluições foram diferentes no extrato de bagaço e pré-hidrolisado de bagaço, por força da metodologia empregada, os dois substratos, extrato e licor, provenientes da mesma remessa de bagaço, puderam ser comparados em relação ao teor de açúcar, transformando os açúcares em ambas soluções em açúcar por cento bagaço. Obteve-se para extrato, 3,26 kg de AT por 100 kg de bagaço e no licor 7,79 kg de AT por 100 kg de bagaço (Tabela 6). Desses resultados pode-se constatar que houve hidrólise da hemicelulose do bagaço com aumento no teor de açúcares no licor de 138,95%.

Com a pré-hidrólise do bagaço houve desdobramento de hemicelulose em melibiose, glucose, xilose e arabinose, aumentando o teor de açúcares no licor (Tabela 8), onde xilose é o principal componente do hidrolisado, de acordo com DU TOIT *et alii* (1984), seguido de glucose, arabinose e melibiose. A maior quantidade de glucose, relacionada aos outros componentes, segundo o mesmo autor, pode ser proveniente da hidrólise de substâncias como amido, de celulose amorfa e mesmo sacarose presentes no bagaço.

Pela proporção dos monossacarídeos liberados na hidrólise a vapor e porque a hemicelulose A (hemicelulose precipitada por ácidos) é mais facilmente hidrolisável, supõe-se que esta tenha sido a hidrolisada por esse processo.

4.2. Ensaios

Os resultados obtidos nos ensaios realizados neste trabalho encontram-se nas Tabelas 9 a 23.

Para cada grupo de ensaios são especificadas as condições experimentais: unidade do fermento, matéria seca de fermento inoculado, volume de substrato utilizado e açúcar total do extrato e do licor.

São apresentados para cada grupo de ensaios os valores encontrados para massa seca de células após fermentação, massa seca de células obtidas na fermentação, açúcares residual e consumido, valores para razão de crescimento celular, rendimentos e eficiências em relação ao açúcar

total e ao açúcar consumido, bem como pH e acidez acética antes e após fermentação.

Os ensaios serão analisados separadamente, (Ensaio I), ou em conjunto, (Ensaio II a V e VI a IX), para as mesmas condições experimentais.

4.2.1. Ensaio I (sem aeração)

As condições experimentais do Ensaio I se encontram na Tabela 9.

Tabela 9 - Condições experimentais do Ensaio I (sem aeração).

VARIÁVEIS	ENSAIO I
U_x (%)	67
M_{x0} (mg/100 ml)	330
V (ml)	100
AT_1 (mg/100 ml)	310
AT_2 (mg/100 ml)	1720

O Ensaio I foi realizado sem aeração e obteve-se rendimento médio em células de levedura em relação ao açúcar total (η_s), crescendo no licor igual a 3,13% e 18,66% para as células crescendo no extrato, com porcentagem de açúcar consumido igual a 55,72% no licor e 99,54% no extrato (Tabelas 10 e 11). Esse crescimento provavelmente se deve ao

ar contido no frasco de Erlenmeyer e ao ar introduzido pela agitação e esta agitação pode não ter dado condições de atingir os 2 a 4 volumes de ar por volume de mosto por minuto, encontrados por PETERSON *et alii* (1945) com a melhor condução para fermentação aeróbica em hidrolisados, ou esse crescimento se deve ao consumo de álcool que possa ter sido produzido, mas não detectado no final da fermentação. O rendimento em células de levedura no extrato, superior ao encontrado no licor, talvez se deva ao fato de que a agitação fosse suficiente para crescimento da levedura em função da baixa concentração de açúcar no extrato e ao fator inibitório de fermentação no licor representado pela mistura de pentoses e hexoses, segundo FANTI & KOHAN (1963).

Como o açúcar consumido pela levedura no extrato foi quase total (99,54%), o rendimento biológico foi praticamente igual ao rendimento em relação ao substrato: $\eta = 18,74\%$ e $\eta_s = 18,66\%$ (Tabela 11). Para licor η foi maior que η_s , uma vez que a levedura consumiu somente 55,72% do açúcar do licor (Tabela 10).

Na análise do licor após fermentação constatou-se os seguintes teores para os açúcares hidrolisados: melibiose 0,02%, xilose 0,2%, arabinose 0,07%, outros sacarídeos 0,02%, com produção de 0,03% de xilitol.

Tabela 10 - Valores de M_{xf} ; M_x ; A_r ; A_c e $A_c\%$ de AT no Ensaio I.

REPETIÇÕES	MASSA DE CÉLULA (mg)		AÇÚCAR (mg)		A _c % AT
	M _{xf}	M _x	A _r	A _c	
Licor					
1	385	55	791	929	53,99%
2	391	61	728	992	57,67%
3	376	46	765	955	55,51%
m	384	54	761	959	55,72%
Extrato					
4	386	56	1,6	308	99,46%
5	387	57	0,6	309	99,82%
6	390	60	2,1	307	99,32%
m	388	58	1,4	308	99,54%

Tabela 11 - Valores de R_x , η_s , η , ε e ε_s para o Ensaio I.

REPETIÇÕES	R_x	$\eta_s\%$	$\eta\%$	$\varepsilon\%$	ε_s
Licor					
1	16,70	3,20	5,93	12,49	6,74
2	18,42	3,53	6,13	12,91	7,43
3	13,82	2,65	4,78	10,07	5,58
m	16,31	3,13	5,61	11,82	6,58
Extrato					
4	16,85	17,95	18,05	38,08	37,79
5	17,39	18,53	18,57	39,05	39,05
6	18,27	19,47	19,60	41,30	41,02
m	17,50	18,66	18,74	39,48	39,32

O processo com baixo rendimento, a eficiência do processo também foi baixa, com $\epsilon_s = 6,58\%$ para licor e $\epsilon_s = 39,32\%$ para extrato. O rendimento e a eficiência foram baixos o que poderia ser explicado por um consumo de açúcar para a manutenção da células como também pela formação de produtos metabólicos, conforme explicação de SLININGER *et alii* (1982). A eficiência em relação ao açúcar consumido foi 11,82% e 39,48% para licor e extrato respectivamente (Tabela 11).

Houve uma porcentagem de crescimento da levedura no licor de 16,31% e 17,50% para a levedura crescendo no extrato (Tabela 11). Esperava-se no licor uma porcentagem de crescimento maior, uma vez que havia maior quantidade de açúcar disponível para a mesma massa de inóculo, açúcar disponível mas não consumido provavelmente por inibição do substrato FANTI & KOHAN (1963).

O pH medido no final da fermentação, Tabela 12, foi maior que o inicial para licor e para extrato, indicando que houve consumo de ácidos orgânicos durante o crescimento da levedura, fato também observado por HARRIS *et alii* (1948) e RAMOS (1983) em hidrolisados, diminuindo a acidez acética no final da fermentação. No pH inicial tanto do extrato como do licor, a levedura cresce satisfatoriamente; o aumento de pH torna esse crescimento mais rápido aumentando a utilização de açúcar segundo HAJNY (1981).

Tabela 12 - pH e acidez acética do Ensaio I.

REPETIÇÕES	pH		ACIDEZ ACÉTICA (mg/100ml)	
	INICIAL	FINAL	INICIAL	FINAL
Licor				
1	5,3	6,7	101,40	8,40
2	5,3	6,7	101,40	8,40
3	5,3	6,7	101,40	14,40
Extrato				
4	4,1	5,3	42,60	21,60
5	4,1	5,6	42,60	12,00
6	4,1	5,5	42,60	18,00

4.2.2. Ensaios II, III, IV e V (com aeração)

As condições experimentais dos ensaios II a V, apenas com aeração, estão demonstradas na Tabela 13.

Tabela 13 - Condições experimentais dos Ensaios II, III, IV e V (com aeração).

VARIÁVEIS	ENSAIOS			
	II	III	IV	V
U_x (%)	68	60,8	69,2	65,97
M_{x0} (mg/100 ml)	320	392	308	340
V (ml)	100	100	100	100
AT_1 (mg/100 ml)	310	310	310	310
AT_2 (mg/100 ml)	1720	1720	1720	1720

Nos ensaios II, III, IV e V com o extrato de bagaço, houve um consumo médio de açúcar com relação ao açúcar total variando de 95,49 a 99,90% e para o licor de 52,08 a 66,34% (Tabela 14).

O rendimento médio em relação ao açúcar total no extrato em células de leveduras (η_s) variou de 10,53 a 22,95% e o rendimento médio em relação ao açúcar consumido para extrato (η) variou de 10,60 a 24,04% (Tabela 15) com desempenho alternativo entre os ensaios para as mesmas condições. Relacionando o rendimento biológico (η) com o rendimento teórico de HARRISON, 1971: 47,5g de levedura/100g de glucose, obtem-se eficiências de processos biológicos (ϵ) variando de 22,32 a 50,58%. Esses resultados levam a concluir que possivelmente outros produtos foram formados, como etanol, não detectado para extrato, nos Ensaios II, III e V, mas provavelmente produzido pela levedura. Procurou-se no Ensaio IV, com aeração, através de análises a intervalos de 4 horas, verificar o teor em álcool formado durante a fermentação. Os resultados se encontram na Tabela 16. A quantidade de álcool detectada na primeira amostragem foi decrescendo até não dar mais álcool na terceira amostragem, o que evidência um consumo de álcool pela levedura e se permite supor que nos ensaios anteriores onde não se detectou álcool no final da fermentação, ele possa ter-se formado.

Tabela 14 - Valores de M_{xf} ; M_x ; A_r ; A_c ; $A\%$ de AT nos Ensaios II, III, IV e V.

REPETIÇÕES	MASSA DE CÉLULA (mg)					AÇÚCAR (mg)																			
	M_{xf}					M_x					A_r					A_c					$A_{\%AT}$				
	II	III	IV	V		II	III	IV	V		II	III	IV	V		II	III	IV	V		II	III	IV	V	
Licor																									
1	380	401	357	422	60	9*	49	82	767	526	769	842	954	1194	951	878	55,44	69,44	55,30	51,03					
2	363	429	356	428	43	37	48	87	659	543	734	832	1062	1176	986	888	61,72	68,40	57,35	51,62					
3	377	424	372	413	57	32	64	73	723	668	720	798	997	1052	1000	922	57,96	61,17	58,12	53,58					
m	373	418	362	421	53	32	54	81	716	579	741	824	1004	1141	979	896	58,37	66,34	56,92	52,08					
Extrato																									
1	385	374	352	366	65	-**	44	25	13	04	1,4	0	297	305	308	310	95,91	98,59	99,54	100,00					
2	392	425	389	343	72	33	81	03	17	0	-	0,8	293	310	310	309	94,47	100,00	100,00	99,72					
3	398	424	377	425	78	32	69	85	12	04	-	0,1	298	305	310	309	96,08	98,59	100,00	99,97					
m	392	408	373	378	72	32	65	36	14	03	0,5	0,3	295	307	309	309	95,49	99,08	99,85	99,90					

* Valor desprezado para cálculo da média.

** Crescimento negativo de fermento, valor desprezado.

Tabela 15 - Valores de R_x , η , ε e ε_s para os Ensaios II, III, IV e V.

REPETIÇÕES																				
P _x %					n %					ε %					ε _s %					
II	III	IV	V		II	III	IV	V		II	III	IV	V		II	III	IV	V		
Licor																				
1	18,59	2,35*	15,97	23,98	3,48	0,53*	2,86	4,74	0,24	0,77*	5,17	9,30	13,33	1,62*	10,88	19,57	7,34	1,13*	6,02	9,99
2	13,44	9,49	15,98	25,05	2,50	2,16	2,79	5,07	4,05	3,16	4,87	9,83	8,53	6,65	10,28	20,89	5,26	4,55	5,87	10,69
3	17,73	8,16	20,78	21,48	3,30	1,86	3,72	4,25	5,69	3,04	6,40	7,93	11,98	6,40	13,47	16,69	6,98	3,92	7,83	8,95
m	18,59	8,82	17,44	23,70	3,09	2,01	3,12	4,69	5,33	3,10	5,48	9,02	11,22	6,52	11,95	18,98	6,53	4,23	6,57	9,87
Extrato																				
1	20,09	-	14,35	7,43	20,76	-	14,27	8,17	21,65	-	14,34	8,17	45,80	-	30,19	17,21	44,14	-	30,07	17,21
2	22,39	8,42	26,43	0,76	23,10	10,66	26,28	0,84	24,46	10,66	26,28	0,84	51,48	22,44	55,37	1,77	48,90	22,45	55,37	1,77
3	24,17	8,21	22,34	24,98	24,98	10,40	22,22	27,45	26,00	10,59	22,22	27,45	54,86	22,21	48,80	57,80	53,97	21,90	48,90	57,82
m	22,21	8,31	21,04	11,06	22,95	10,53	20,92	12,15	24,04	10,60	20,95	12,15	50,58	22,32	44,12	25,59	48,67	22,17	44,08	25,60

* Valor desprezado para cálculo da média.

Tabela 16 - Dosagens de Etanol no Ensaio IV (ml/100ml).

REPETIÇÕES	% ETANOL EM VOLUME			
	APÓS 4h	APÓS 8h	APÓS 16h	FINAL
Licor				
1	0,03	0,01	0,00	0,00
2	0,09	0,02	0,01	0,00
3	0,03	0,02	0,00	0,01
m	0,05	0,02	0,00	0,00
Extrato				
4	0,05	0,03	0,00	0,00
5	0,02	0,01	0,01	0,01
6	0,02	0,03	0,00	0,01
m	0,03	0,02	0,00	0,00

Parece que pouco açúcar no extrato mais o álcool que poderia ter-se formado foram suficientes apenas para manutenção e pequeno crescimento celular nos ensaios no período de 24 horas.

Como o teor de furfural no licor era baixo, 36 ppm e provavelmente sem causar problemas, foi testado o aumento de inóculo de 1 para 2% de fermento em relação ao substrato, porque um volume maior de inóculo, segundo LEONARD & HAJNY (1945) pode ser usado para vencer um possível potencial de óxido redução desfavorável. O rendimento permaneceu baixo. Para PETERSON *et alii* (1945), um inóculo de 4 g de matéria seca por litro (0,4 g por 100 ml) é considerado um inóculo "pesado", com período de fermentação mais curto, principalmente à temperatura de 34-35°C, a qual

favorece a produção de álcool. Nos ensaios deste trabalho o inóculo a 1% de fermento prensado, aproximadamente 0,3 g matéria seca por 100 ml de substrato já representava uma concentração elevada de células de levedura.

As eficiências do Ensaio V foram para licor: 9,87 em relação ao açúcar total do substrato e 18,98% em relação ao açúcar consumido e para extrato, 25,60% e 25,59%, respectivamente (Tabela 15). Estes resultados de maneira geral, são maiores do que os demais para o licor e menores do que os do extrato.

A razão de crescimento celular no Ensaio V foi 23,70% para levedura crescendo no licor e 11,06% para a levedura crescendo no extrato (Tabela 15), com comportamento semelhante do demonstrado para as eficiências.

Comparando o rendimento em célula de levedura em relação ao açúcar total (η_s) para licor, que variou de 2,01 a 4,69% com o rendimento em relação ao açúcar total para extrato (η_s) de 10,53 a 22,95% (Tabela 15), o rendimento no licor (η_s) foi sempre significativamente menor que o rendimento no extrato (η_s).

Esta observação reforça a hipótese de que uma mistura de hexoses e pentoses por si só é um fator inibitório de fermentação (FANTI & KOHAN, 1963) e que outros inibidores de fermentação podem ser encontrados nos hidrolisados lignocelulósicos provenientes da hemicelulose, da lignina e extrativos da matéria-prima, apontados por TRAN & CHAMBERS (1986), cujos compostos não foram ainda estudados.

Os baixos valores encontrados para o rendimento devem estar associados a possível formação de etanol e de outros componentes como xilitol e arabitól.

Relacionando o rendimento em células de levedura em relação ao açúcar consumido do licor (η) com o rendimento em relação ao açúcar consumido do extrato, o rendimento (η) do licor (3,10 a 9,02%) foi da ordem de três a quatro vezes menor que o rendimento (η) no extrato (10,60 a 24,04), o que se verificou também no Ensaio I (Tabela 11). Isto demonstra que, provavelmente outros produtos foram formados como etanol, xilitol ou arabitól ou que D-xilose, principal componente da pré-hidrólise, não foi usada para crescimento da levedura como observou HSIAO *et alii* (1982).

As eficiências do processo em relação ao açúcar total do substrato (ϵ_s) variaram de 4,23 a 6,53% para licor e de 22,17 a 48,67% para extrato. As eficiências do processo em relação ao açúcar consumido foram de 6,52 a 18,98% para licor e de 22,32 a 50,58% para extrato (Tabela 15), demonstrando as dificuldades encontradas pela levedura em meios com diferentes fatores de inibição.

A razão de crescimento celular foi de 8,82 a 23,70% para a levedura crescendo no licor e de 8,31 a 22,21% para a levedura crescendo no extrato (Tabela 15).

O pH final dos ensaios oscilou de 6,62 a 8,30 para licor e de 4,62 a 6,48 para extrato, pH final de fermentação acima do pH inicial para cada substrato, Tabela 17, com consumo de ácidos orgânicos segundo HARRIS *et alii* (1948), da mesma maneira que ocorreu no Ensaio I.

Tabela 17 - pH e acidez acética dos Ensaios II, III, IV e V.

REPETIÇÕES	pH					ACIDEZ ACÉTICA				
	INICIAL					FINAL				
	II	III	IV	V		II	III	IV	V	
Licor										
1	5.30	5.37	5.30	5.33	8.05	734.41	98.00	80.40	88.00	108.00
2	5.30	5.37	5.30	5.33	8.12	734.41	98.00	80.40	88.00	114.00
3	5.30	5.37	5.30	5.33	8.08	734.41	98.00	80.40	88.00	120.00
Extrato										
1	4.00	4.03	4.00	4.05	4.82	6.10	5.75	6.45	284.00	38.40
2	4.00	4.03	4.00	4.05	4.85	6.40	5.58	5.70	284.00	38.40
3	4.00	4.03	4.00	4.05	4.80	6.30	6.48	6.05	284.00	38.40

4.2.3. Ensaios VI, VII, VIII e IX (com aeração e suplementação de sais).

As condições experimentais dos Ensaios de VI a IX, são apresentadas na Tabela 18.

Tabela 18 - Condições experimentais dos Ensaios VI, VII, VIII e IX (com aeração e suplementação de sais).

VARIÁVEIS	ENSAIOS			
	VI	VII	VIII	IX
U_x (%)	68,1	69,6	69,1	68,1
M_{x0} (mg/100 ml)	319	304	309	319
V (ml)	100	100	100	100
AT_1 (mg/100 ml)	310	310	310	310
AT_2 (mg/100 ml)	1720	1720	1720	1720

Nos ensaios VI, VII, VIII e IX foram feitas suplementações de sais dos substratos com nitrogênio, fósforo e potássio. Houve uma reação significativa para licor alcançado rendimento em leveduras variando de 5,61 a 20,99% em relação ao açúcar total do substrato e de 8,49 a 27,72% em relação ao açúcar consumido (Tabela 19), valores estes bem maiores do que os obtidos para os Ensaios I a V, nos quais não foi feita a suplementação.

Tabela 19 - Valores de R_x , η , η_s , ϵ e ϵ_s para os Ensaios VI, VII, VIII e IX.

REPETIÇÕES	R_x									η									ϵ									ϵ_s								
	VI	VII	VIII	IX	VI	VII	VIII	IX	VI	VII	VIII	IX	VI	VII	VIII	IX	VI	VII	VIII	IX	VI	VII	VIII	IX	VI	VII	VIII	IX	VI	VII	VIII	IX	VI	VII	VIII	IX
Licor																																				
1	114.70	69.15	117.42	30.41	21.27	12.23	21.08	5.03	27.70	17.55	28.10	7.93	58.33	38.90	59.15	16.71	44.78	25.74	44.39	11.66																
2	90.00	63.23	114.67	32.60	16.69	11.18	20.59	6.07	22.59	16.40	26.63	9.29	47.59	34.52	56.03	19.57	35.14	23.54	43.34	12.79																
3	119.12	121.08	118.62	27.81	22.09	21.41	21.30	5.12	27.66	26.82	28.42	8.24	59.65	59.47	59.83	17.34	49.51	45.07	44.83	10.78																
Σ	107.94	84.49	116.00	30.34	20.02	14.94	20.99	5.61	26.05	20.26	27.72	8.49	54.85	42.63	58.34	17.87	42.14	31.43	44.19	11.81																
Extrato																																				
1	23.35	16.90	17.10	18.00	24.06	16.60	17.05	16.50	24.50	16.78	17.03	20.13	51.59	35.45	38.62	42.53	50.69	34.99	35.92	41.09																
2	22.13	13.97	17.45	18.52	22.80	13.72	17.40	20.08	22.80	14.24	17.74	21.02	48.03	29.93	37.43	44.43	48.03	28.91	36.67	42.31																
3	23.57	18.12	19.62	20.28	24.28	17.79	19.76	20.86	24.28	18.07	19.98	21.70	51.16	36.00	42.21	45.81	51.16	37.48	41.83	43.94																
Σ	23.02	16.93	18.12	19.59	23.71	16.04	18.07	20.19	23.86	16.36	18.26	20.95	50.86	34.46	38.52	44.26	49.95	33.78	36.07	42.45																

A porcentagem de açúcar consumido no licor pelas células de levedura foi de 66,18 a 76,65% (Tabela 20), o que indicaria o consumo total ou quase total dos açúcares do licor, segundo HARRIS *et alii* (1948), que encontrou uma porcentagem de 25% de substâncias redutoras não açúcares após o término da fermentação em hidrolisado quando 75% de açúcar haviam sido consumidos. Este consumo também foi maior do que o verificado para os ensaios sem suplementação.

Nos ensaios VI e VIII verificou-se que o rendimento encontrado em células secas de levedura no licor, em relação ao açúcar total (Tabela 19), está próximo ao observado por JOHNSON & HARRIS (1948) para *Saccharomyces cerevisiae* na primeira transferência, de uma série de transferências da levedura em hidrolisado com aproximadamente 5% AT. Mas, deve-se salientar que nos ensaios VII e IX este rendimento esteve muito aquém daqueles observados pelos mesmos autores (Tabela 3).

As eficiências foram de 11,81 a 44,18% em relação ao açúcar total do licor e de 17,87 a 58,34% em relação ao açúcar consumido (Tabela 19), também denotando eficiências maiores do que os ensaios não suplementados (Tabelas 11 e 15). Com pH final de fermentação ao redor de 7,50, com consumo de ácidos orgânicos pelas células de levedura (Tabela 21), observa-se o mesmo comportamento do que para os demais ensaios. (HARRIS *et alii*, 1948).

A razão de crescimento celular variou de 30,34 a 116,90% (Tabela 19), significativamente maior do que a dos ensaios não suplementados (Tabelas 11 e 15).

Tabela 20 - Valores de M_{xf} ; M_x ; A_r ; A_c ; $A\%$ de AT nos Ensaios VI, VII, VIII e IX.

REPETIÇÕES	MASSA DE CÉLULA (mg)					AÇÚCAR (mg)						
	M_{xf}					A_r						
	M_x	M_x	M_x	M_x	M_x	A_c	A_c	A_c	A_c	A_c		
	VI	VII	VIII	IX	VI	VII	VIII	IX	VI	VII	VIII	IX
Licor												
1	663	514	671	415	366	210	363	97	399	522	430	499
									1321	1198	1290	1221
2	606	498	663	423	287	192	354	104	449	548	390	596
									1271	1172	1330	1124
3	699	672	675	407	380	368	366	88	356	347	431	650
									1364	1373	1289	1070
m	663	561	670	415	344	257	361	96	401	472	417	582
									1319	1248	1303	1138
Extrato												
1	393	355	362	379	74	51	53	60	5.6	30	0	10
									304	306	310	300
2	390	347	363	381	71	42	54	62	0	11	5.8	14
									310	298	304	296
3	394	359	370	383	75	55	61	65	0	5	3.3	12
									310	305	306	298
m	392	354	365	381	73	49	56	62	1.9	6	3.0	12
									308	303	307	298
									99.40	97.89	99.01	98.20

Para extrato encontrou-se nos Ensaaios VI a IX, rendimento em células secas de levedura em relação ao açúcar total do extrato variando de 16,04 a 23,71% e de 16,36 a 23,86% em relação ao açúcar consumido, Tabela 19. Os rendimentos para extrato nos ensaios VI a IX, foram de maneira geral pouco superiores aos encontrados para extrato nos ensaios II a V, com aeração e sem suplementação de sais (Tabela 15). Isso se deve, talvez, ao fato de que as quantidades de nutrientes existentes nos substratos já se encontravam ao nível das necessidades da levedura.

As eficiências para extrato nos Ensaaios VI a IX foram: eficiência em relação ao açúcar total do substrato variando de 33,78 a 49,96% e eficiência em relação ao açúcar consumido de 34,46 a 50,26%, (Tabela 19), com 96,20 a 99,40% de açúcar consumido do total do açúcar do extrato, Tabela 20.

A razão de crescimento celular encontrada nos Ensaaios VI a IX para a levedura crescendo no extrato teve uma variação de 16,33 a 23,02% (Tabela 19), da mesma ordem dos ensaios não suplementados.

Os baixos rendimentos e eficiências encontrados em todos os ensaios para levedura crescendo no extrato, talvez sejam explicados pelo baixo teor de açúcar total, igual a 0,31%, utilizado não só para crescimento mas também manutenção das células num período de 24 horas, em fermentação em batelada, sem alimentação de substrato.

O pH final de fermentação no extrato variou de 7,0 a 8,5 (Tabela 21), indicando consumo de ácidos orgânicos

Tabela 21 - pH e acidez acética dos Ensaios VI, VII, VIII e IX.

REPETIÇÕES	pH				ACIDEZ ACÉTICA							
	INICIAL				FINAL				INICIAL			
	VI	VII	VIII	IX	VI	VII	VIII	IX	VI	VII	VIII	IX
Licor												
1	5.33	5.30	5.30	5.30	7.23	7.40	7.60	7.80	80.80	58.80	61.20	66.00
2	5.33	5.30	5.30	5.30	7.40	7.43	7.70	7.70	80.80	58.80	61.20	66.00
3	5.33	5.30	5.30	5.30	7.60	7.43	7.60	7.70	80.80	58.80	61.20	66.00
Extrato												
1	4.10	4.00	4.10	4.00	8.12	8.40	7.50	7.70	19.20	21.18	22.20	24.00
2	4.10	4.00	4.10	4.00	8.40	7.15	7.60	7.90	19.20	21.18	22.20	24.00
3	4.10	4.00	4.10	4.00	8.30	8.50	7.00	7.60	19.20	21.18	22.20	24.00

pela levedura, conforme HARRIS *et alii* (1948), considerando o que ocorreu também nos demais ensaios (Tabelas 12 e 17).

Os rendimentos em células secas de levedura em relação ao açúcar total foram reunidos na Tabela 22, a qual dá uma visualização das modificações realizadas nos Ensaios com a finalidade de melhorar a fermentação e os resultados alcançados nessas fermentações.

Tabela 22 - Rendimento em massa seca de células de levedura em relação ao açúcar total do extrato do digestor e do licor (%). (Média de 3 repetições para η_s).

ENSAIOS	I *	II **	III **	IV **	V ***	VI ***	VII ***	VIII ***	IX ***
SUBSTRATOS									
Licor	3,13	3,09	2,01	3,12	4,69	20,02	14,94	20,99	5,61
Extrato	18,66	22,95	10,53	20,92	12,15	23,71	16,04	18,07	20,15
* Sem Aeração						[com suplementação de sais]			
** Com Aeração									
*** Com Maior Aeração									

Esses rendimentos foram calculados sobre o açúcar total das soluções licor e extrato. Transformando o açúcar total do licor e o açúcar total do extrato de bagaço em açúcar total por cento bagaço, foram obtidos açúcar total do licor igual a 7,79% bagaço e açúcar total do extrato igual a 3,26% bagaço (Tabela 6). Fazendo a conversão dos rendimentos em células secas de levedura em relação ao subs-

trato para quilograma de levedura por 100 kg de bagaço, os resultados para η_s passaram a ser os da Tabela 23 onde se observa que nos Ensaios VI, VII e VIII, com suplementação de nutrientes, o licor apresentou um maior rendimento em levedura por 100 kg de bagaço processado comparado com o extrato.

Tabela 23 - Rendimentos médios em leveduras em relação aos açúcares totais do licor e extrato em kg por 100 kg bagaço.

ENSAIOS	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
SUBSTRATOS									
Licor	0,24	0,24	0,16	0,24	0,37	1,56	1,17	1,64	0,44
Extrato	0,61	0,75	0,34	0,68	0,39	0,77	0,52	0,59	0,66

5. CONCLUSÕES

1. Com a pré-hidrólise do bagaço houve desdobramento de hemicelulose em melibiose, glucose, xilose e arabino-se, aumentando o teor de açúcares no licor.
2. Foi obtido crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* no pré-hidrolisado de bagaço de cana-de-açúcar com maior produção de massa seca de células quando o licor foi suplementado com nitrogênio e potássio.
3. Constatou-se que houve consumo de xilose pela levedura com produção de xilitol.
4. Nas concentrações utilizadas de açúcar total no licor e extrato de bagaço a produção de leveduras por quilograma de bagaço foi maior no licor que no extrato.
5. Existem substâncias inibidoras desconhecidas que prejudicaram o crescimento da levedura no licor de bagaço de cana-de-açúcar.

6. Não compensa a produção de leveduras a partir de licor de bagaço obtido por autoclavagem nas condições estudadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMORIM, H.V.; ZAGO, E.A.; OLIVEIRA, A.J. Análises para o controle da fermentação alcoólica e aparelhos de destilação. Piracicaba, ESALQ, 1979. 50 p.
- BANERJEE, N.; BHATNAGAR, R.; VISWANATHAN, L. Inhibition of glycolysis by furfural in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlim, 11: 226-8, 1981.
- BERTO, D.A. Levedura seca de destilaria de álcool de cana-de-açúcar (*Saccharomyces spp*) na alimentação de leitões em recria. Piracicaba, 1985. 133 p. (Mestrado Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- BORZANI, W. & AQUARONE, E. Effect of arabinose on glucose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology*, Baltimore, 6(4): 225-8, Jul. 1958.
- BUENO NETTO, C.L. Influência da concentração inicial de células e do tempo de enchimento da dorna do processo descontínuo alimentado de fermentação alcoólica de mosto de melaço de cana-de-açúcar. São Paulo, 1982. 147 p. (Mestrado Escola Politécnica/USP).
- CAMPOS NETO, O.; GONÇALVES, H.C.; ZEZZA NETO, L. Utilização do bagaço de cana hidrolisado e levedura seca (*Saccharomyces cerevisiae*), resíduo da produção de álcool na alimentação de cabra leiteira. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE

DE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 24., Brasília, 1987. **Anais.**
Brasília, S.B.Z., 1987. p. 123.

CIRILLO, V.R. Relationship between sugar structure and competition for the sugar transport system in baker's yeast. *Journal of Bacteriology*, Baltimore, 95(2): 603-11, Feb. 1968.

COOPERATIVA DOS PRODUTORES DE CANA, AÇÚCAR E ALCOOL DO ESTADO DE SÃO PAULO LTDA. Controle químico da fabricação do açúcar. Piracicaba, 1978. 127 p.

D'ARCE, R.D. & MACHADO, P.F. Resíduos agroindustriais da cana-de açúcar na alimentação de ruminantes. In: D'ARCE, R.B., BOIN, C.; MATTOS, W.R.S. Utilização de resíduos agroindustriais na alimentação de ruminantes. Piracicaba, FEALQ, 1985. p. 1-17.

DELGADO, J.U.; AGUILERA, R.C., GARCÍA, A.G. Productos de la hidrólisis de los derivados de la caña de azúcar. In: INSTITUTO CUBANO DE INVESTIGACIONES DE LOS DERIVADOS DE LA CAÑA DE AZÚCAR. La industria de los derivados de la caña de azúcar. La Habana, Ed. Científico - Técnica, 1986. Cap. 9, 251-76.

DE MARTIN, V.F. Efeito da remoção de células sobre o rendimento da fermentação alcoólica por leveduras. Piracicaba, 1987. 188 p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

DESMONTS, R. Tecnologia da produção dos fermentos secos de destilaria. *Boletim Informativo da A.P.M.*, Piracicaba, 8(2): 1-11, jun., 1966a.

DESMONTS, R. Importância do fermento seco na luta da subnutrição protéica e a carência vitamínica B. *Boletim*

Informativo da A.P.M., Piracicaba, 8(4): 5-14, dez., 1966b.

DULANEY, E.L.; STAPLEY, E.O.; SIMPF, K. Studies on ergosterol production by yeasts. *Applied Microbiology*, Baltimore, 2(6): 371-9, Nov., 1954.

DU TOIT, P.J.; OLIVIER, S.P.; VAN BILJON, P.L. Sugar cane bagasses as a possible source of fermentable carbohydrates. I. Characterization of bagasse with regard to monosaccharide, hemicellulose, and amino acid composition. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 26: 1071-8, 1984.

FANTI, O.D. & KOHAN, T. Fermentation y desarrollo de levaduras en hidrolizados de materiales celulosicos. *Revista de Investigaciones Agricolas*, Buenos Aires, 17(3): 273-87, 1963.

FAZANO, A.R.T. Digestibilidade e valor biológico da proteína da levedura seca (*Saccharomyces* spp) e do farelo de soja para coelhos. Piracicaba, 1986. 64 p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

FIALHO, E.T.; GOMES, P.C.; ALBINO, L.F.T.; COSTA, V. Determinação de valores de composição química e de digestibilidade de alguns ingredientes nacionais para suínos. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, 12(2): 337-56, 1983.

FLANNERY, R.J. Nonagricultural sources of food. *Food Technology*. Champain, 29(8): 64-6, Aug. 1975.

FREY, C.N. History and development of the modern yeast industry. *Industrial and Engineering Chemistry*, Washington, 22(11): 1154-62, 1930.

- GLORIA, N.A. & SANTA ANA, A.G. Métodos de análises de resíduos de usinas de açúcar e destilarias. *Revista de Agricultura, Piracicaba*, 1(1/2): 37-8, out., 1975.
- GOMORI, G. A modification of the colorimetric phosphorus determination for use with the photoelectric colorimeter. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, St. Louis, 27: 955-60, 1942.
- GONG, C.; CHEN, L.; FLICKINGER, M.C.; CHIANG, L.; TSAO, G.T. Production of ethanol from D-xylose by using D-xylose isomerase and yeasts. *Applied Environmental Microbiology*, Washington, 41(2): 430-6, Feb. 1981.
- GONG, C.; CLAYPOOL, T.A.; MCCracken, L.D.; MAUN, C.M.; UENG, P.P.; TSAO, G.T. Conversion of pentoses by yeasts. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 25(1): 85-102, Jan., 1983.
- GUSAROVA, L.A. Effect of furfural on the biosynthesis of protein and nucleic acids by yeast, *Candida tropicalis*. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 6(5): 509-15, 1970. Apud *Chemical Abstracts*, Easton, 74(3): 211, ref. 11869, 1971. (Resumo).
- HAJNY, G.L. Biological utilization of wood for production of chemicals and foodstuffs, Madison, USDA. Forest Products Lab., 1981. (For, Serv. Res. Pap. FPL, 385).
- HARRIS, E.E.; SAEMAN, J.F.; MARQUARDT, R.R.; HANNAN, M.L.; ROGERS, S.C. Fodder yeast from wood hydrolysates and still residues. *Industrial and Engineering Chemistry*, Washington, 40(7): 1220-3, Jul., 1948.
- HARRISON, J.S. Yeast production. *Progress in Industrial Microbiology*, New York, 10: 129-77, 1971.

HORII, J. & STUPIELLO, J.P. Determinação de álcool; teor alcoólico da vinhaça. Piracicaba, ESALQ, Departamento de Tecnologia Rural, 1970. 3 p. (Mimeografado).

HSIAO, H.I.; CHIANG, L.C.; UENG, P.P.; TSAO, G.T. Sequential-utilization of mixed monosacharides by yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 43: 840-5, Apr. 1982.

HSU, W. Protein from sugar on Taiwan. *Sugar y Azúcar*, New York, 56(7): 33-6, 1961.

INSTITUTO CUBANO DE INVESTIGACIONES DE LOS DERIVADOS DE LA CAÑA DE AZÚCAR. Bagaço. In: _____. *La Industria de los Derivados de la Caña de Azúcar*. La Habana, Ed. Científico-Técnica, 1986. cap. 4, p. 111-30.

JEFFRIES, TH. W. Utilization of xylose by bacteria, yeast and fungi. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, New York, 27: 1-32, 1983.

JOHNSON, M.C. & HARRIS, E.E. Acclimatization of various yeasts to wood sugar. *Journal of the American Chemical Society*, Easton, 70(9): 2961-3, Sept., 1948.

JOSLYN, M.A. Alcoholometry. In: _____, ed. *Methods in food analysis*. 2 ed.. New York, Academic Press, 1970. cap. 15, p. 447-74.

KATAGIRI, H. The influence of the fatty acids and their salts on alcoholic fermentation by living yeast. Part I. Acetic and formic acids and their sodium, potassium and ammonium salts. *Biochemical Journal*, Cambridge, 20(2): 427-36, 1926.

KILBERG, R. The microbe as a source of food. *Annual Review of Microbiology*, California, 26: 427-66, 1972.

KLING, S.H.; BARBOSA, M.F.S.; OLIVEIRA, W. Aproveitamento integral dos resíduos lignocelulósicos em particular do bagaço de cana-de-açúcar. In: SEMANA DA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA, 4, Piracicaba, 1985. *Anais*. Piracicaba, ESALQ/STAB, 1985. p. 62-70.

KLING, S.H.; CARVALHO NETO, C.; FERRARA, M.A.; TORRES, J.C.R.; MAGALHÃES, D.B.; RYU, D.D.Y. Enhancement of enzymatic hydrolysis of sugar cane bagasse by steam explosion pretreatment. *Biotechnology and Bioengineering*, New York, 29(8): 1035-9, 1987.

KRONKA, R.N.; CURTARELLY, S.M.; KRONKA, S. de N.; ALCADEPANI, D.; RAMOS, I.A. Uso da levedura seca (*Saccharomyces cerevisiae*) de destilaria de álcool de cana-de-açúcar e farelo de arroz na alimentação de suínos (experimento 2). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 24., Brasília, 1987. *Anais*, Brasília, S.B.Z., 1987. p. 001.

LACORTE, M.C.; BURGI, R.; LACORTE, A.J.F. Bagaço de cana hidrolisado já utilizado em larga escala em confinamento. *STAB; Açúcar e Álcool e Subprodutos*, Piracicaba, 5(2): 43-52, nov./dez., 1986.

LEONARD, R.H. & HAJNY, G.L. Fermentation of wood sugars to ethyl alcohol. *Industrial and Engineering Chemistry*, Washington, 37(4): 390-5, Apr. 1945.

LIMA, G.J.M.M. de. Uso de levedura seca (*Saccharomyces cerevisiae*) de destilaria de álcool de cana-de-açúcar na alimentação de matrizes suínas em gestação e lactação. Piracicaba, 1983. 139 p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

LIMA, O.G. Desenvolvimento da indústria da levedura alimentar e a contribuição brasileira. *Brasil Açúcareiro*, Rio de Janeiro, 67(3): 24-45, mar. 1966.

MACHADO, P.F. Valor nutritivo da levedura, resíduo da produção do álcool para vacas em lactação. Piracicaba, 1983. 110 p. (Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP).

MACHADO, P.F.; D'ARCE, R.D.; MATTOS, W.R.S. Valor nutritivo da levedura seca (*Saccharomyces Sp.*) para ruminantes. I. Consumo digestibilidade, produção e composição do leite. In: REUNÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 20., Pelotas, 1983. *Anais*, Pelotas, S.B.Z., 1983. p. 81.

MATTOS, W.R.S.; D'ARCE, R.D.; MACHADO, P.F.; MARCOS, A.C.M. Avaliação da qualidade da proteína de levedura seca (*Saccharomyces cerevisiae* - sp.). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 20, Pelotas, 1983. *Anais*. Pelotas, S.B.Z., 1983. p. 119.

MATTOS, W.R.S.; D'ARCE, R.D.; MACHADO, P.F. El uso de levadura de fermentación alcohólica en la alimentación de los ruminantes. In: GRUPO DE PAISES LATINO AMERICANOS Y DEL CARIBE EXPORTADORES DE AZÚCAR. *Uso Alternativo de la caña de azúcar para energía y alimento*. México, GEPLACEA, 1987. p. 113-23.

MEEKER, E.W. & WAGNER, E.C. Titration of ammonia in presence of boric acid. *Industrial and Engineering Chemistry, Analytical Edition*, Easton, 5(6): 396-8, Nov., 1933.

MENEZES, T.J.B. & HIOSHII, S.H. Efeito do tratamento do bagaço de cana na extensão da hidrólise da celulose. *Coletânea do ITAL*, Campinas, 12: 123-35, 1981/82.

MENTEM, J.F.M.; LIMA, G.J.M.M.; PAKER, I.U.; MIYADA, V.S.; LAVORENTI, A. Níveis de uréia e ácido úrico no sangue de porcas alimentadas com rações contendo levedura seca. In: REUNÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 21, Belo Horizonte, 1984. Anais, Belo Horizonte, S.B.Z., 1984. p. 204.

MIYADA, V.S. Uso da levedura seca (*Saccharomyces cerevisiae*) de destilarias de álcool de cana-de-açúcar na alimentação de suínos em crescimento e acabamento. Piracicaba, 1978. 106 p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

MIYADA, V.S. & LAVORENTI, A.. Uso da levedura seca (*Saccharomyces cerevisiae*) de destilarias de álcool de cana-de-açúcar na alimentação de suínos em crescimento e acabamento. Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Viçosa, 8(3): 497-515, 1979.

MOREIRA, J.R.A. Uso da levedura seca (*Saccharomyces cerevisiae*) de destilarias de álcool de cana-de-açúcar em rações isocalóricas para suínos em crescimento e acabamento. Piracicaba, 1984. 107 p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

MOURA, E.C.V.; BATISTA, M.; MENDES, A.A. Efeito da substituição da proteína de carne e/ou do peixe pela biomassa protéica, na alimentação de frangos de corte. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 19., Piracicaba, 1982. Anais, Piracicaba, S.B.Z., 1982. p. 24.

OLIVEIRA, E.R.; VALSECHI, O.; STUPIELLO, J.P.; DELGADO, A.A.; CESAR, M.A.A.; NOVAES, F.V. Elementos de controle químico das Usinas de Açúcar de Cana. Piracicaba, ESALQ/ Departamento Tecnologia Rural, 1974. 140 p.

- PASSOS, D.M.; ROMANUS, O.; CAMPELLO, J.P. Técnicas analíticas para controle de fermentações. In: BACILA, M. Curso de fisiologia de microrganismos. Curitiba, s. ed., 1960. p. 14-5.
- PATURAU, J.M. Bagasse. In: _____. By-products of the Cane Sugar Industry. Amsterdam. Elsevier, 1969. cap. 3, p. 25-42.
- PAYNE, J.H. ed. Sugar cane factory analytical control. Amsterdam, Elsevier, 1968. 190 p.
- PEPPLER, H.J. Food yeasts. In: ROSE, A.H. & HARRISON, J.S. The yeasts. New York, Academic Press, 1970. v. 3, cap. 8, p. 421-62.
- PETERSON, W.H.; SNELL, J.F.; FRAIZER, W.C. Fodder yeast from wood sugar. Industrial and Engineering Chemistry, Washington, 37(1): 30-5. Jan. 1945.
- PETROVIC, S. Influence of furfural on the assimilation rate sugars and on the yeast activity in synthetic and hydrolysed media. Drev. Vysk, 2: 67-78, 1969. Apud Chemical Abstracts, Easton, 72(3): 208, ref. 11376, 1970. (Resumo).
- PEZZATO, A.C. Utilização de levedura na alimentação de monogásticos; I. Aves. In: SEMANA DE ZOOTECNIA, 6.; SIMPÓSIO SOBRE APROVEITAMENTO DE SUBPRODUTOS DA AGROINDÚSTRIA NA ALIMENTAÇÃO ANIMAL, 1., Botucatu, 1985. Anais. Botucatu, UNESP, 1985. p. 37-55.
- PEZZATO, L.E.; POLANO, S.A.; SAUCEDO, E.C.A.; FAUSTINI FILHO, S.T.; FRÉ, C.A. Levedura seca (*Saccharomyces cerevisiae*) de álcool de cana-de-açúcar na alimentação de frangos de corte. In: REUNÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 19. Piracicaba, 1982. Anais. Piracicaba, SBZ., 1982. p. 25.

PYKE, M. Food science and tecnologia. London, John Murray, 1964. 211 p.

RAMOS, C. Influence of pH and of some bases on the fermentation of chemical hydrolysates. Rev. Ciências Biológicas, 14(1): 11-6, 1983. Apud Tate & Lyles's Sugar Industry Abstracts, Brussels, 47(5): 181, Sept./Oct. 1985. (Resumo).

RAMOS, C.; LOPES, R.; LLERENA, L. Study of batch fermentation with *Candida utilis* Y-900 in chemical prehydrolysates from pith. Rev. Ciências Biológicas, 10(2): 301-11, 1979. Apud Tate & Lyles's Sugar Industry Abstracts, Brussels, 44(3): 99, May/June, 1982. (Resumo).

RAMOS, C.; NAPOLES, I.; LOPES, R.; Improved production of yeasts from hydrolytic syrup in order to evaluate its nutritional quality. Rev. Ciências Biológicas, 14(4): 17-25, 1983. Apud Tate & Lyles's Sugar Industry Abstracts, Brussels, 47(5): 181, Sept./Oct. 1985. (Resumo).

SALES, A.M.; MENEZES, T.J.B.; OKADA, M.; ARAKAKI, T. LAMO, P.R. Produção e avaliação nutricional de biomassa protéica de levedura em melaço. Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos, Campinas, 8: 443-55, 1977.

SLAGLE, S.P. & ZIMMERMAN, D.R. Evaluation of yeast single cell protein with young pigs. Journal of Animal Science, Champaign, 49(5): 1252-60, 1979.

SLININGER, P.J.; BOTHAST, R.J.; VAN CAUWENBERGE, J.E.; KURTZMAN, C.P. Conversion of D-xylose to ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*. Biotechnology and Bioengineering, New York, 24(2): 371-84, Feb. 1982.

- STAKHORSKAYA, L.K. & KATS, N.I. Effect of hidroxy-methylfurfural on yeast grown in continuous cultures. Sb. Tr. Vses. Nauch. - Issled. Inst. Hidroliza Rast. Mater, 17:97-101, 1968. Apud Chemical Abstracts Easton, 72(3): 103, ref. 10240, 1970. (Resumo).
- STAMFORD, T.L.M. Utilização do licor residual de pré-hidrólise do bagaço de cana-de-açúcar para produção de proteína microbiana por - *Aspergillus Niger* Van Tieghen. Piracicaba, 1979. 92 p. (Mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- TAMBURO, M.E.; GINTERS, K.M.; LUCHESE, L.; ARRIGONI, M.B.; PEZZATO, A.C. Efeito da adição de diferentes níveis de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) de álcool de cana-de-açúcar, sobre a umidade das excretas de frangos de corte. In: REUNIÃO ANUAL DA S.B.Z., 19., Piracicaba, 1982. Anais, Piracicaba, S.B.Z., 1982. p. 26.
- TRAN, A.V. & CHAMBERS, R.P. Ethanol fermentation of red oak acid prehydrolysate by the yeast *Pichia stipitis* CBS 5776. Enzyme Microbiology and Technology, Stoneham, 8: 439-44, 1986.
- VALSECHI, O. Tecnologia da celulose do bagaço de cana-de-açúcar para papel; estudos relativos à influência da medula. Piracicaba. 1964. 288 p. (Cátedra - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).
- VANANUVAT, P. & KINSELLA, J. E. Amino acid composition of protein isolates from *Saccharomyces fragilis*. Journal of Agriculture and Food Chemistry, Easton, 23(3): 595-7, 1975.
- VILLALÓN, R. & TAGLE, M.A. Las levaduras como recursos proteicos de la dieta humana, algunos aspectos de su problemática. ICIDCA, Habana, 7(3): 3-12, 1973.

VILLELA, G.G.; BACILA, M.; TASTALDI, H. Técnica e experimento de bioquímica. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1973. 552 p.

WALDROUP, P.W. & HAZEN, K.R. Yeast grown on hydrocarbon fractions as a protein source in the diet of laying hens. Poultry Science, Ithaca, 54: 635-7, 1975.

WEIGERT, B.; KLEIN, C.; RIZZI, M. LAUTERBACH, C.; DELLWEG, H. Xylose fermentation by yeasts, 8. Influence of furfural on the aerobic growth of the yeast. *Pichia stipilis*. Biotechnology Letters, new York, 10(12): 895-900, 1988.

WHITE, J. Bakers' yeast, Historical: yeast physiology and nutrition. In: WHITE, J. Yeast technology. London, Chapman and Hall, 1954. cap. 2, p. 12-26.