

PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *Aspergillus Oryzae*
UTILIZANDO VINHAÇA COMO SUBSTRATO
DE FERMENTAÇÃO

WALDEMAR GASTONI VENTURINI FILHO

Orientador: RODOLPHO DE CAMARGO

Dissertação apresentada à Escola Superior
de Agricultura «Luiz de Queiroz», da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Mestre em Agronomia. Área
de Concentração: Tecnologia de Alimentos.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Junho, 1986

DEDICATÓRIA:

Aos meus pais, irmãos e sobrinhas;
os quais, cada um à sua maneira,
contribuíram para a realização deste
trabalho.

AGRADECIMENTOS

O autor agradece àqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho; com destaque para as seguintes pessoas:

- Professor e Orientador RODOLPHO DE CAMARGO, pelo apoio e orientação prestada no decorrer do trabalho experimental e na elaboração desta dissertação e, fundamentalmente, pelo seu espírito de coleguismo e cordialidade para com seu orientado;

- Professores HÉLCIO FALANGHE e RAHME NELY WEDER, pela cessão das instalações e equipamentos do Laboratório de Fermentação e, principalmente, pela amizade fraterna para com seu aluno;

- Professores JORGE HORII e MARCO A. A. CEZAR, pela cessão das instalações e equipamentos do Laboratório de Álcool e Açúcar;

- Professor LUIZ GONZAGA DE SOUZA, da FCA/UNESP/Botucatu, pela sua indispensável colaboração na redação final desta dissertação;

- Professora ADÉLIA MARIA SALATI M. LLISTÓ, da FCA/UNESP/Botucatu, pela sua amizade e espírito de colaboração, que foram decisivos na conclusão deste trabalho;

- Professor NEY MORAES, da FOB/USP/Bauru, pelos esclarecimentos estatísticos dos resultados experimentais;

- Bibliotecárias LÚCIA V. A. BOTELHO e MIDIAN NELLY da ESALQ/USP/Piracicaba, THEREZINHA COLETTA da FOB/USP/Bauru e CÉLIA R. INOUE da Biblioteca Municipal de Bauru;

- Técnicos DIRCEU MORAES, LUICYR CRISTAL, NEUSA SANTOS e BENEDICTO NICOLAU, pela ajuda prestada durante a fase experimental deste trabalho;

- Secretárias MARTHA FERNANDES MARTINS e MARIA DE LOURDES SAPADIN TREVISAN, da FCA/UNESP/Botucatu, pelo auxílio prestado com os serviços de datilografia;

- Funcionários WILIAM McFADEN, JOÃO DE CARVALHO, ROSA MENDES e EDSON FRANZONI, pelo apoio pessoal;

- Funcionários da Gráfica do "Campus" de Botucatu/UNESP, especialmente ao Senhor JOSÉ C. C. CARREIRA, pela impressão desta dissertação.

Í N D I C E

	Página
RESUMO	xii
SUMMARY	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1. <u>Composição da Vinhaça</u>	5
2.2. <u>Tratamentos da Vinhaça</u>	7
2.2.1. Lagoa de Oxidação	7
2.2.2. Tratamento Físico-Químico	8
2.2.3. Lançamento no Mar	8
2.2.4. Utilização na Piscicultura Intensiva .	9
2.2.5. Reciclagem na Indústria	10
2.2.6. Concentração	11
2.2.7. Fertirrigação	12
2.2.8. Fermentação Anaeróbica	14
2.2.9. Fermentação Aeróbica	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1. <u>Material</u>	31
3.1.1. Vinhaça	31

	Página
3.1.2. Microrganismos	32
3.2. <u>Métodos</u>	32
3.2.1. Preparo do Substrato	32
3.2.2. Preparo do Inóculo	35
3.2.3. Parâmetros da Fermentação	36
3.2.4. Separação e Secagem da Biomassa	36
3.2.5. Determinação de Nitrogênio Total e Proteína Bruta	37
3.2.6. Determinação da Demanda Bioquímica de Oxigênio - DBO_5	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1. <u>Produção de Biomassa e Proteína de <i>A. oryzae</i> em Meio de Flegmaça, Flegmaça Substituída por Vinhaça em Doses Crescentes e Meio de Vinhaça ..</u>	38
4.2. <u>Produção de Biomassa e Proteína de <i>A. oryzae</i> em Meio Mínimo, Meio Mínimo Substituído por Vinhaça em Doses Crescentes e Meio de Vinhaça</u>	44
4.3. <u>Produção de Biomassa e Proteína de <i>A. oryzae</i> em Meio Completo, Meio Completo Substituído por Vinhaça em Doses Crescentes de Meio de Vinhaça</u>	51

4.4.	<u>Influência da Fração Sólidos em Suspensão da Vinhaça na Produção de Biomassa e Proteína de <i>A. oryzae</i></u>	54
4.5.	<u>Influência do pH inicial de Meios de Vinhaça na Produção de Biomassa e Proteína de <i>A. oryzae</i></u> ..	58
4.6.	<u>Influência da Relação VF/VM na Produção de Biomassa e Proteína de <i>A. oryzae</i> em Meio de Vinhaça</u>	62
4.7.	<u>Taxa de Redução da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO₅) e Produção de Biomassa e Proteína de <i>A. oryzae</i> em Meio de Vinhaça, sob Diferentes Tempos de Fermentação</u>	66
5.	CONCLUSÕES	74
6.	LITERATURA CITADA	78
	APÊNDICE	87

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1 - Crescimento de <i>A. oryzae</i> em Meio de Flegmaça, Meios de Flegmaça Substituída Progressivamente por Vinhaça e Meio de Vinhaça	40
Tabela 2 - Crescimento de <i>A. oryzae</i> em Meio Mínimo, Meio Mínimo Substituído Progressivamente por Vinhaça e Meio de Vinhaça	46
Tabela 3 - Composição Química do Meio Mínimo e de Vinhaça de Mosto Misto	48
Tabela 4 - Crescimento de <i>A. oryzae</i> em Meio Completo, Meio Completo Substituído Progressivamente por Vinhaça e Meio de Vinhaça	52
Tabela 5 - Influência da Fração Sólidos em Suspensão de Meios de Vinhaça no Crescimento de <i>A. oryzae</i>	56
Tabela 6 - Influência do pH Inicial de Meios de Vinhaça no Crescimento de <i>A. oryzae</i>	60

Tabela 7 - Influência da Relação VF/VM no Crescimen <u>to</u> de <i>A. oryzae</i> em Meio de Vinhaça	64
Tabela 8 - Influência do Tempo de Fermentação no Crescimento de <i>A. oryzae</i> em Meio de Vinha <u>ça</u>	68
Tabela 9 - Taxa de Redução da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO ₅) de Vinhaça Fermentada com <i>A. oryzae</i> , em Função do Tempo de Fermenta <u>ção</u>	69
Tabela 10 - Influência da Relação VF/VM no Crescimen <u>to</u> de <i>A. oryzae</i> em Meio de Vinhaça	88

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1 - Crescimento de <i>A. oryzae</i> em Meio de Flegma <u>ça</u> , Meios de Flegma <u>ça</u> Substitu <u>í</u> da Progres <u>s</u> ivamente por Vinha <u>ça</u> e Meio de Vinha <u>ça</u> ..	41
Figura 2 - Crescimento de <i>A. oryzae</i> em Meio M <u>í</u> nimo, Meio M <u>í</u> nimo Substitu <u>í</u> do Progressivamente por Vinha <u>ça</u> e Meio de Vinha <u>ça</u>	47
Figura 3 - Crescimento de <i>A. oryzae</i> em Meio Completo, Meio Completo Substitu <u>í</u> do Progressivamente por Vinha <u>ça</u> e Meio de Vinha <u>ça</u>	53
Figura 4 - Influ <u>ê</u> ncia da Fra <u>ç</u> ão S <u>ó</u> lidos em Suspens <u>ã</u> o de Meios de Vinha <u>ça</u> no Crescimento de <i>A. oryzae</i>	57
Figura 5 - Influ <u>ê</u> ncia do pH Inicial de Meios de Vinha <u>ça</u> no Crescimento de <i>A. oryzae</i>	61
Figura 6 - Influ <u>ê</u> ncia da Relaç <u>ã</u> o VF/VM no Crescimento de <i>A. oryzae</i> em Meio de Vinha <u>ça</u>	65

Figura 7 - Influência do Tempo de Fermentação na Taxa de Redução da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO_5) e no Crescimento de <i>A. oryzae</i> em Meio de Vinhaça	70
Figura 8 - Influência da Relação VF/VM no Crescimento de <i>A. oryzae</i> em Meio de Vinhaça	89

PRODUÇÃO DE BIOMASSA DE *Aspergillus oryzae* UTILIZANDO VINHAÇA
COMO SUBSTRATO DE FERMENTAÇÃO.

CANDIDATO: Waldemar Gastoni Venturini Filho

ORIENTADOR: Rodolpho de Camargo

RESUMO

Vinhaça de mosto misto foi utilizada como substrato de fermentação visando a produção de biomassa de *Aspergillus oryzae*. Avaliou-se, também, a taxa de redução da carga poluente da vinhaça após o processo fermentativo.

Os trabalhos experimentais foram realizados utilizando frascos erlenmeyer de 250 ml, contendo 100 ml de substrato esterilizado, com pH corrigido para 5,0. O inóculo constituiu-se numa suspensão de esporos cujo volume foi de 5 ml. Os frascos foram agitados a 100 rpm por 72 horas, na temperatura de 30°C. A separação da biomassa foi feita por filtração e sua secagem, em estufa a 70°C, por 72 horas. Avaliou-se o teor de proteína bruta na biomassa multiplicando-se os valores do nitrogênio total - obtido pelo método micro Kjeldahl - pelo fator de 6,25.

O teor de vinhaça nos meios de cultivo influenciou na forma de crescimento do fungo; passou da forma de pêletes para um aspecto amorfo e cotonoso, em função do aumento de

seu nível na composição dos substratos. O meio de vinhaça possibilitou a produção de duas vezes mais biomassa quando comparado ao meio completo para *Aspergillus* e foi equivalente a este na produção de proteína bruta. Observou-se que os sólidos em suspensão presentes na vinhaça contribuíram positivamente na produção de biomassa e proteína bruta. Em meio de vinhaça, obteve-se melhor crescimento do *A. oryzae* em pH inicial 6,0; ao passo que, o aumento da relação volume do frasco/volume de meio determinou mudança no tipo de crescimento: de submerso passou para superficial com produção crescente de esporos. Observou-se uma correlação negativa entre a produção de biomassa e o teor de proteína bruta na mesma, fazendo com que a produção final de proteína tendesse para um valor constante. Constatou-se, por outro lado, uma estreita correlação entre os valores da produção de biomassa e os da taxa de redução da DBO_5 no efluente. A vinhaça, após sofrer fermentação com *A. oryzae*, apresentou taxa de redução da DBO_5 de até 84,4%; e mesmo assim, continuou apresentando elevada carga poluente.

BIOMASS PRODUCTION OF *Aspergillus oryzae* UTILIZING VINASSE AS
FERMENTATION SUBSTRATE.

CANDIDATE: Waldemar Gastoni Venturini Filho

ADVISER: Rodolpho de Camargo

SUMMARY

Mixed must vinasse was utilized as fermentation substrate aiming biomass production of *Aspergillus oryzae*. Reduction rate of vinasse pollutant load was evaluated after the fermentative process.

Experimental works were realized utilizing 250 ml erlenmeyer flasks, containing 100 ml of sterilized substrate, with initial pH level corrected to 5,0. Starter was constituted of a spores suspension, with a volume of 5 ml. Flasks were shaken at 100 rpm for 72 hours; fermentation temperature was 30⁰C. Biomass separation was executed by filtration and dried in stove at 70⁰C for 72 hours. Biomass crude protein levels was evaluated multiplying the total nitrogen values - obtained by micro Kjeldahl method - by 6,25 factor.

Vinasse concentration in the culture media influenced on fungal growth form. It changed from pellets to a cottony and amorphous aspect, because of the vinasse level

increase on the substrates composition. Vinasse media allowed a biomass production increased in two times when confronted to *Aspergillus* complete media and it was equivalent to this on the crude protein production of *A. oryzae*. It was observed that solids in suspension present in vinasse contributed positively to the biomass and crude protein production. With vinasse media *A. oryzae* grew better on initial pH 6,0; while as, the increase of the volume of flask/volume of media ratio determined change on the growth pattern: from submerge growth passed to superficial growth, with a crescent spores production. It was observed a negative correlation between the biomass production values and the biomass crude protein values, to making the final protein production come to a constant value. It was verified, otherwise, a straight correlation between the biomass production values and DBO_5 reduction rates on effluent. Vinasse, after fermentation process, presented DBO_5 reduction rate up to 84,4%, even thus, it continued showing a high pollutant load.

1. INTRODUÇÃO

O Programa Nacional do Alcool (PROALCOOL) foi criado em 1975 visando equilibrar a balança comercial do país, através da substituição das importações de petróleo pela produção nacional de álcool carburante. O PROALCOOL fez com que a produção brasileira de etanol saltasse da cifra de 0,6 bilhões de litros na safra 75/76 para mais de 11 bilhões na safra 85/86 (BERTELLI, 1982 e IEA, 1986). Concomitantemente, a produção de vinhaça aumentou nas mesmas proporções, tornando-se, de fato, um grave problema ambiental a ser solucionado.

Conceitua-se vinhaça como sendo o resíduo da destilação dos vinhos. É conhecida, ainda, com as seguintes denominações: vinhoto, restilo, garapão, calda, etc. (STUPIELLO et alii, 1972).

Pela quantidade em que é produzida, a vinhaça torna-se o principal resíduo ou subproduto do processo de fabricação do álcool etílico; em média, a produção de um litro

de álcool gera 13 litros de vinhaça (ARAÚJO et alii, 1978; CAMHI, 1979; SILVA, 1981; ORLANDO FILHO, 1983 e PAULA EDUARDO e DIAZ, 1983).

A vinhaça, por ser um efluente rico em matéria orgânica, apresenta elevado índice de DBO - Demanda Bioquímica de Oxigênio, isto é, um alto poder poluente quando descartada "in natura" nos cursos d'água. A força poluente (DBO) da vinhaça é, em média, cerca de cem vezes superior à do esgoto doméstico (ANÔNIMO, 1981).

Em 1985, a produção brasileira de álcool, segundo meta fixada pelo PROALCOOL, deveria ser de 10,7 bilhões de litros de álcool (BERTELLI, 1982). Entretanto, essa meta foi superada, ficando a produção nacional acima da cifra dos 11 bilhões de litros, gerando assim um volume de vinhaça da ordem dos 150 bilhões de litros (IEA, 1986).

A vinhaça sendo produzida em quantidades desta ordem de grandeza dentro das regiões sucro-alcooleiras, constitui-se em problema ambiental não devidamente resolvido. Embora a Comissão Executiva Nacional do Álcool - CENAL, tenha baixado normas tornando obrigatórios os sistemas de tratamento da vinhaça, além da completa proibição de seu descarte em rios, estas vêm sendo desobedecidas (ANÔNIMO, 1981).

Há duas formas de encarar a problemática da vinhaça na atual conjuntura da produção alcooleira do país. A primeira é considerá-la como um resíduo do processo de destilação do álcool etílico. A segunda, como um subproduto, isto

é, matéria-prima a ser utilizada em outros processos.

Na condição de resíduo, a vinhaça pode ser tratada das seguintes formas:

- a) em lagoa de oxidação;
- b) em tratamento físico-químico;
- c) lançamento no mar.

Os dois primeiros métodos visam basicamente a redução da carga poluente da vinhaça, possibilitando o seu posterior descarte nos cursos d'água. Nesses processos poderão haver recuperação de subprodutos, tais como: biomassa microbiana ou lodo (CAMHI, 1979 e NICOLAIEWSKY, 1981).

A vinhaça, considerada como subproduto da fabricação do álcool, pode ser aproveitada como matéria-prima, dentre outros, nos seguintes processos:

- a) Arraçoamento, na piscicultura;
- b) Reciclagem na indústria, na diluição de mosto, etc.;
- c) Concentração a 60⁰Brix, para utilização como componente de ração animal, adubo na lavoura ou queimado para produção de fertilizantes;
- d) Fertirrigação da lavoura canavieira ou outras culturas;

- e) Fermentação anaeróbica, na produção de gás metano;
- f) Fermentação aeróbica, na produção de proteína microbiana.

Nota-se que a redução da carga poluente da vinhaça é uma decorrência e não o fim principal desses processos de tratamento (DIAS, 1980; SILVA, 1981a e 1981b; BARD e PAIVA, 1981; ZARPELON, 1982 e ORLANDO FILHO, 1983).

A fermentação aeróbica da vinhaça vem sendo estudada em nosso meio desde a década de 40, sendo que os trabalhos pioneiros nesse campo foram desenvolvidos na Universidade do Recife. Nesse tratamento utiliza-se como agente de fermentação, as leveduras - geralmente do gênero *Candida*, fungos filamentosos ou ainda, os cogumelos - fungos do grupo dos Basideomicetos. A finalidade básica da digestão aeróbica da vinhaça é produzir proteína microbiana com vistas à sua utilização em rações animais, e concomitantemente reduzir a carga poluente do efluente, em função da assimilação de compostos orgânicos e minerais por parte dos microrganismos utilizados nesse processo.

O presente trabalho tem por objetivo o estudo da produção de biomassa de *Aspergillus oryzae* em vinhaça de mosto misto, utilizada como substrato de fermentação; como também, avaliar a redução do poder poluente da vinhaça em função do tratamento adotado.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Consultando a literatura especializada constata-se que, desde a década de 30, a vinhaça já era vista pelos técnicos do setor sucro-alcooleiro e autoridades públicas, como um problema ambiental a ser equacionado. No início da década seguinte, BOTINI e SACCONI (1941) e FILGUEIRAS (1941) já propunham tratamentos baseados na remoção de umidade da vinhaça visando a produção de adubos. Em 1955, FILGUEIRAS abria um leque de sete possíveis tratamentos para a vinhaça com a finalidade básica de produzir fertilizantes; a maioria deles ainda estão em estudo nos dias de hoje.

2.1. Composição da Vinhaça

LIMA (1959) estudando a composição da vinhaça de mosto de melaço, encontrou baixos teores de substâncias nitrogenadas (0,07%) e fosfatadas (0,08%). Observou a presença de ácidos orgânicos voláteis (0,24%) e fixos (0,28%). Anali

sando a fração sólidos em suspensão notou que esta era constituída principalmente de células mortas de leveduras e de outros microrganismos, além de mucilagem. Segundo o autor, essa fração apresentando 42,69% de proteína bruta, deve ser levada em consideração na produção de biomassa microbiana.

Da mesma forma, SERZEDELLO (1970) também observou a riqueza do "resíduo da vinhaça" em células de levedura.

Análises de vinhaça de melaço realizadas por ARAÚJO et alii (1977) revelaram a presença de carboidrato (1,77%), açúcares redutores (0,80%), glicerol (2,1%) e pequenas quantidades de compostos nitrogenados e fosfatados.

MARTELLI e SOUSA (1978) estudando a composição da vinhaça de caldo de cana verificaram a sua pobreza em açúcares totais, cujo teor correspondia a 10% da quantidade da matéria orgânica total. Ensaio cromatográfico revelou a presença de sacarose, frutose e vários aminoácidos, principalmente leucina, isoleucina e valina.

Em trabalho de revisão, GLÓRIA e ORLANDO FILHO (1984), compilaram dados de 59 artigos publicados por pesquisadores de todas as regiões canavieiras do Brasil. Observaram que a matéria orgânica é o principal constituinte da vinhaça, cujo teor varia de 2,0 a 6,4% e que dentre os elementos minerais o potássio aparece em destaque, com sua concentração variando de 0,15 a 0,60%. A vinhaça proveniente de mosto de melaço apresenta maior teor de nutrientes, isto é, maior concentração de sólidos orgânicos e minerais, quando

comparada àquela proveniente de mosto de caldo. As vinhaças de mosto misto¹ e de mandioca apresentam composições intermediárias em relação às duas primeiras.

2.2. Tratamentos da Vinhaça

2.2.1. Lagoa de Oxidação

Para CAMHI (1979), as alternativas de tratamento da vinhaça para diminuir o seu potencial poluidor, são anti-econômicas ou tecnicamente difíceis de se implementar. Como consequência propõe a utilização de lagoas de oxidação, cujo processo é econômico, tecnológico e financeiramente factível de ser desenvolvido. Segundo o autor, a operação desse sistema é baseada na atividade biológica combinada de diferentes microrganismos, funcionando aeróbica e anaerobicamente. A estabilização da matéria orgânica é feita por bactérias, fungos e algas, que fornecem a maior parte do oxigênio requerido no processo. Para cada quilograma de matéria orgânica estabilizada, as bactérias produzem 0,4 kg de biomassa microbiana, os fungos 0,3 kg e as algas a mesma quantidade. Teoricamente, é possível atingir a completa utilização das substâncias orgânicas oriundas da vinhaça, até reduzir a sua DBO em

¹/ Mosto misto - mosto proveniente da mistura, em proporções adequadas, de melaço, caldo de cana e água.

mais de 95%. A biomassa oriunda do processo é secada a 10 - 15% de umidade, para produzir um concentrado proteico de alto valor biológico, com características semelhantes à proteína da soja.

2.2.2. Tratamento Físico-Químico

NICOLAIEWSKY (1981), aplicou técnicas de floculação, sedimentação e filtração no beneficiamento da vinhaça, tal como ocorre no tratamento convencional de águas residuais. Utilizou em seu trabalho vinhaça de mosto de melão, misto e de mandioca. Observou que existe a necessidade de se utilizar doses maciças de cal para causar a floculação dessas vinhaças. A filtração, de uma forma geral, mostrou-se como o tratamento mais eficiente para a redução da carga poluente das vinhaças. A demanda química de oxigênio - DQO, foi reduzida em até 40% com esse tratamento. O autor concluiu que apenas o tratamento físico-químico utilizado para a vinhaça de mosto misto apresenta características de um processo economicamente viável, porém, recomendou estudos sobre o aproveitamento do lodo resultante da sedimentação (adubação, correção de solo, recirculação) e da água de lavagem dos filtros de areia (fertirrigação).

2.2.3. Lançamento no Mar

Segundo VISCONTI et alii (1981), os métodos

atê então utilizados para o tratamento da vinhaça não poderão alcançar os efeitos desejados, devido ao grande volume de vinhaça gerado no Brasil. Afirmou que os processos de tratamento de vinhaça, com exceção da fertirrigação, são importados e desenvolvidos em países cujas condições são distintas do Brasil, ou seja: há pouca disponibilidade de terras e envolvem processos de alta tecnologia, que tornam-se inviáveis à medida que aumenta-se a quantidade de vinhaça a ser tratada. Para os autores, a vinhaça não apresentando substâncias tóxicas, germes patogênicos e substâncias gordurosas, pode ser lançada no mar. O efeito poluente do efluente depende da quantidade lançada, do volume do corpo receptor (mar) e da distância do local de lançamento. Ainda segundo esses autores, uma vez oxidado o material orgânico da vinhaça juntamente com os sais minerais presentes, passariam a constituir alimento muito rico para peixes e vegetais aquáticos, causando, inclusive, benefícios ao ecossistema marítimo. Propõem que a vinhaça seja transportada ao mar através de dutos: os "vinhotodutos".

2.2.4. Utilização na Piscicultura Intensiva

Potencialmente, pelo menos três subprodutos da indústria sucro-alcooleira podem ser aproveitados na piscicultura intensiva: torta de filtro - rica em fósforo; levedura - alto teor de proteína; vinhaça - pela riqueza em matéria orgânica e mineral. Desses, a vinhaça é o que causa maior número

de problemas devido à sua força poluente. Assim, BARD e PAIVA (1981) propuseram a instalação de projetos pilotos com a construção de viveiros e/ou lagoas de oxidação adaptados à criação de tilápias ao lado das destilarias. Para esse tipo de tratamento, a tilápia do Nilo (*Sarotherodon niloticus*) é a espécie mais indicada pela sua adaptação em ambientes aquáticos ricos em matéria orgânica e com baixo teor de oxigênio dissolvido. O inconveniente desse processo é a descontinuidade do suprimento da vinhaça, mas esse problema pode ser equacionado se se consegue outras formas de arraçoamento durante a época da entressafra da cana.

2.2.5. Reciclagem na Indústria

Para destilarias localizadas em regiões onde a vinhaça não pode ser aplicada ao solo, como é o caso das baixadas litorâneas e a norte-nordeste ou para aquelas cuja área de aplicação é limitada, SILVA (1981a e 1981b) sugeriu tratamento dentro da indústria, utilizando equipamentos próprios da fabricação do açúcar. Propõe que a vinhaça seja clarificada com leite de cal e posteriormente decantada no decantador Dorr. A vinhaça clarificada, com sua DBO reduzida em 30%, retorna ao processo industrial sofrendo diluição com a água de lavagem da cana ou ainda pode ser enviada para tratamento em lagoas de oxidação. O lodo (decantado) pode ser secado em cilindros (como para levedura) originando um farelo proteico

(14% de proteína); ou ainda, misturado com bagacinho e filtrado em filtro Oliver resultando em torta de vinhaça utilizada como adubo, ou simplesmente, ser enviado "in natura" para a lavoura.

Para ZARPELON (1982), uma outra forma de reciclar ou recircular a vinhaça na indústria é utilizá-la no preparo de mosto, para diluir melaço ou caldo concentrado. Desta forma, obtem-se uma redução do volume de vinhaça igual à porcentagem de recirculação adotada. Segundo o autor, o limite teórico para recirculação da vinhaça é o ponto em que a concentração de substâncias inibidoras no vinho comece a prejudicar a fermentação. Na prática o controle da reciclagem da vinhaça é simples, ficando restrito ao controle do Brix da vinhaça obtida e ao grau alcoólico do vinho. Para a implantação desse processo o caldo deve ser cuidadosamente decantado, livre de bagacinho, argila e outras substâncias em suspensão.

2.2.6. Concentração

Segundo CAMHI (1979), diferentes processos de concentração da vinhaça estão sendo investigados no Brasil, embora não exista uma visão clara com respeito à economia real destes processos. O produto concentrado seria utilizado como adubo, concentrado proteico para alimentação animal ou queimado com recuperação de K_2O (fertilizante). Para esse autor, a concentração da vinhaça através de evaporadores de múltiplos efeitos é a mais adequada.

tiplo efeito é antieconômica, devido aos enormes volumes de água a serem evaporados. Propõe como alternativa um sistema com recompressão mecânica do vapor, onde ele é comprimido para elevar seu nível de energia, aumentando o rendimento do processo.

DANTAS (1980) recomendou a substituição de melão por vinhaça concentrada como componente de ração animal, tal como já acontece nos países europeus. Para tanto, o autor baseou-se em experimento realizado na Estação Experimental de Cabo (PE), em 1964, onde animais, sob condições experimentais, tiveram o mesmo ganho de peso quando alimentados com vinhaça concentrada ou melão.

Para que o processo de concentração da vinhaça seja economicamente viável, NILSSON (1981) propõe que o produto concentrado seja queimado, aproveitando a energia contida em seus componentes orgânicos. Desse processo resulta a produção de cinzas, ricas em K_2O , que serão utilizados como fertilizantes.

2.2.7. Fertirrigação

O uso da vinhaça em fertirrigação foi estudado de forma pioneira pela equipe técnica do Instituto Zimotécnico de Piracicaba, no início da década de 50. Além dos estudos de composição de vários tipos de vinhaça, ALMEIDA et alii (1952a e 1952b) e ALMEIDA (1952) desmistificaram o falso

conceito, tão corrente naquela época, de que a fertirrigação com vinhaça (pH entre 4 e 5) contribuía para acidificar ainda mais os solos paulistas. Seus experimentos mostraram que so los tratados com vinhaça, em dosagens crescentes, tiveram um aumento proporcional do pH; além de ter incrementado, também, sua capacidade de embebição. Por outro lado, ALMEIDA (1953) e CAMARGO (1954) demonstraram que a vinhaça quando aplicada ao solo, estimulava a vida microbiana, aumentando extraordinariamente a quantidade de microrganismos. Tais resultados de monstraram a potencialidade da vinhaça para ser utilizada na fertirrigação das culturas.

Segundo ORLANDO FILHO et alii (1983), a vinhaça, devido à sua riqueza em matéria orgânica e nutrientes mi nerais, principalmente potássio e cálcio, tem substituído to tal ou parcialmente as adubações minerais de parte dos cana viais. Na fertirrigação, a vinhaça pode ser utilizada "in na tura" ou diluída, principalmente com águas servidas no proce so industrial.

Para GLÓRIA e ORLANDO FILHO (1984), a vinhaça pode ser distribuída no campo por diversos métodos, tais co mo: inundação; sulcos de infiltração; aspersão e veículos tan ques. Independentemente do sistema utilizado, é necessária a presença de área de segurança, onde a vinhaça é depositada quando as demais opções de utilização não estão em funciona mento. Para esses pesquisadores, está comprovado que a apli cação de vinhaça de forma racional em canaviais, aumenta a

produtividade da cultura.

2.2.8. Fermentação Anaeróbica

A vinhaça pode ser fermentada anaerobicamente, visando dupla finalidade: reduzir sua carga poluente e, ao mesmo tempo, gerar biogás de uso combustível. Segundo CAMPOS e GONÇALVES (1981a e 1981b) e DIAS (1981), esse tipo de fermentação, levada a efeito em fermentadores chamados biodigestores, realiza-se basicamente em duas fases: num primeiro estágio as macromoléculas (carboidratos, gorduras, proteínas) presentes no vinhoto, sofrem fermentação ácida na qual há formação de ácidos orgânicos (propiónico e acético), álcoois, aldeídos e ácidos graxos. Num segundo estágio há formação de gás metano pela atividade das bactérias metanogênicas. Segundo CAMPOS e GONÇALVES (1981a) o biogás resultante dessa fermentação é uma mistura de 50 - 60% de metano (CH_4) e 40 - 50% de gás carbônico (CO_2). O rendimento, obtido em escala experimental, para vinhaça de melaço é de 38 litros de gás/litro de vinhaça, bem abaixo, portanto, dos rendimentos de outros resíduos orgânicos: esterco bovino, 330; de galinha, 430; de suíno, 350; e resíduos vegetais, 400. Segundo CAMPOS (1979) pode-se obter, no processo, uma redução de 96 - 98% da DBO no efluente final.

2.2.9. Fermentação Aeróbica

Em 1959, LIMA desenvolveu pesquisa no intuito de estudar o comportamento da levedura *Candida utilis* H-141 em meio de vinhaça isenta de sólidos em suspensão e suplementada com sulfato e fosfato de amônio. O autor verificou que o cultivo desse microrganismo em vinhaça tende a conduzir a reação do meio à alcalinidade, demonstrando o consumo de ânions orgânicos existentes no substrato. Quando se trabalhou com pH mantido por volta de 4,3 e com cepa de levedura adaptada à vinhaça, observou-se um rápido consumo de ácidos voláteis e dos redutores mais facilmente assimiláveis. A concentração de células no substrato foi alta: 8,0 mg/ml na terceira hora, atingindo o valor máximo de 11,1 mg/ml em 12 horas. Constatou-se que o rendimento da fermentação quando calculado a partir de substâncias redutoras (hexose) atingem valores excessivamente altos, evidenciando a boa utilização pela levedura de substâncias orgânicas não açúcares. Já, a porcentagem de carbono utilizada pela levedura em relação ao carbono total orgânico do substrato, foi em média 37,6%, indicando a existência, na vinhaça, de substâncias dificilmente assimiláveis. O autor concluiu, finalmente, que a economia desse processo de levedificação depende do grupo de substâncias orgânicas não açúcares, devido sua alta concentração na vinhaça e dos possíveis estimulantes de crescimento presentes nesse meio.

FALANGHE (1962) estudando o desenvolvimento de fungos do grupo dos Basideomicetos em substrato de vinhaça, verificou que de dez espécies estudadas, apenas três foram capazes de crescer em meio de vinhaça: *Agaricus campestris*, *Boletus indecisus* e *Tricholoma nudum*. Nos experimentos, o autor utilizou vinhaça, vinhaça concentrada ou diluída, suplementada com sulfatos de amônio, magnésio, fosfato de monopotássio e traços de ferro e zinco. A produção máxima de micélio foi conseguida com 288 horas de fermentação. Em meio de vinhaça, a produção de biomassa e seu teor em proteína foram de: *A. campestris*, 10,5 g/l e 44,5%, respectivamente; *B. indecisus*, 20,8 g/l e 23,8% e *T. nudum*, 15,6 g/l e 27,9%. A produção de proteína (g/l) para essas três espécies foi praticamente a mesma (variou de 4,3 a 5,0 g/l). *A. campestris* e *B. indecisus* produziram maior quantidade de biomassa e proteína quando cresceram em meio de vinhaça, em concentração crescente; o inverso aconteceu quando se utilizou a diluição progressiva com água. O autor observou que nos meios de vinhaça mais concentrados, os carboidratos são assimilados preferencialmente enquanto nos diluídos os sólidos totais são consumidos percentualmente em maiores quantidades pelos fungos.

SERZEDELLO (1962), em estudo teórico, propôs que a fermentação aeróbica da vinhaça visando a produção de proteína microbiana, seja estudada dentro do contexto da carência alimentar existente no mundo e particularmente no Brasil. O autor afirma que a utilização da vinhaça como

substrato limita a escolha de microrganismos fermentadores por se tratar de um meio pobre em nutrientes e possuidor de elementos tóxicos à vida. Pesquisas apontam a levedura *Torulopsis utilis* (*Candida utilis*) como a mais apropriada para fermentar vinhaça, pois não é nutricionalmente exigente e apresenta grande voracidade. Durante a fermentação, a vinhaça não deve ter mais que 1% em açúcares, a fim de se evitar a formação de etanol, baixando o rendimento do processo. Se necessário, pode-se fazer a diluição do efluente com água. Para suprir as necessidades nutricionais da levedura em fósforo e nitrogênio, adiciona-se fosfato de amônio na quantidade de um grama por litro de substrato. O pH deve ser corrigido para 4,5 com ácido sulfúrico. A alimentação da dorna e aeração deve seguir a cinética de crescimento da levedura. O autor propõe o uso do sistema de fermentação em batelada em vez do contínuo, para se evitar problemas de infecção. O cálculo de rendimento do processo não deve ser feito em função apenas de açúcares, pois a levedura assimila outros tipos de compostos orgânicos; mas sim em função do total da matéria carbonada contida na vinhaça. Finalizando, o autor afirma que a biomassa de levedura obtida da fermentação aeróbica da vinhaça encerra 50% de proteína (no peso seco) de ótimo valor biológico, bom nível de sais minerais e todas as vitaminas do complexo B.

Segundo SERZEDELLO et alii (1970), o rendimento das fermentações utilizando vinhaça como substrato, visando

a produção de leveduras alimentares, é baixo e a composição química da biomassa, pobre. No intuito de reverter esse quadro, os autores utilizaram *Torula utilis* - IZ 1166 para fermentar vinhaça, isenta de seu resíduo de decantação. Os tratamentos constaram da adição isolada ou acompanhada de fosfato monoácido de amônio (0,1%), glicose (1%) e resíduo decantado autolisado (10%). De acordo com os resultados encontrados, os autores verificaram ser a vinhaça, isoladamente, um substrato pobre para a produção de células de levedura. Sua fermentação teve rendimento de 3,30 g de biomassa seca por litro de vinhaça e o teor da proteína bruta foi de 37%. A vinhaça enriquecida pelo seu próprio resíduo autolisado aumentou em mais de 50% a produção de massa celular e cerca de 12% o teor de compostos nitrogenados. Os autores concluíram que adição de glicose à vinhaça não contribuiu para incrementar a porcentagem de proteína, mas favoreceu a produção de biomassa. Citam, ainda, que os testes comprovaram uma nítida deficiência da vinhaça em nutrientes fosfatados e nitrogenados, uma vez que adição de $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ proporcionou aumento de 66% na massa celular e 37% na proteína bruta.

CANTARELLI (1972) estudou a utilização de vinhaça de milho, como substrato para a produção de micélio de cogumelos. De sete espécies, apenas *Agaricus campestris*, *Tricholoma nudum* e *Pleurotus ostreatus* foram capazes de crescer em meio de vinhaça pura - sem enriquecimento. As maiores produções de biomassa foram obtidas com 7 dias de fermentação;

sendo que, a suplementação do meio de vinhaça com sulfato de amônio permitiu a melhor produção de proteína. O autor observou, também, alta eficiência fermentativa, devido à utilização da fração "não açúcar" - ácidos orgânicos e polióis - do meio de vinhaça, pelos fungos fermentadores.

EL NAWAWI e FOUUDA (1975) estudaram o desenvolvimento de leveduras do gênero *Candida*, com vistas à produção de proteína microbiana, em substratos de melão, vinhaça e resíduo de fábrica da levedura de panificação. Trabalhando com as espécies *C. utilis*, *C. pellicullosa* e *C. tropicalis*, os autores verificaram que a levedura *C. pellicullosa* mostrou-se a mais eficiente para fermentar meio de melão; entretanto, o seu rendimento em biomassa foi o mais baixo em meio de vinhaça e melão diluído com vinhaça. Já a levedura *C. tropicalis* mostrou-se a mais apta para fermentar a vinhaça, apresentando maior rendimento em produção de biomassa. Quando se utilizou como substrato melão diluído com vinhaça o rendimento de biomassa caiu para as leveduras testadas, mostrando a presença de substâncias inibidoras na vinhaça. Os autores concluíram ser a levedura *C. pellicullosa* a mais adequada para fermentar meios de melão, resíduo de levedura de panificação e mistura desses dois substratos; enquanto que *C. tropicalis* deve ser usada na fermentação de vinhaça.

TAUK (1976) utilizou várias leveduras do gênero *Candida* e *Torulopsis* para fermentar vinhaça pura, sem qualquer tipo de enriquecimento. A autora afirmou que a composição

da biomassa obtida (proteína bruta variou de 15,6 a 38,1%) apresentou baixos teores de proteína total, fósforo e cinzas, quando comparada com a composição de leveduras do gênero *Torula* (proteína bruta por volta de 50%), citada pela literatura. A autora acredita serem os processos fermentativos que não exigem o enriquecimento da vinhaça os mais acessíveis para utilização nas destilarias de álcool; sendo que, a obtenção de linhagens de leveduras adaptadas à vinhaça poderia facilitar o uso industrial desses microrganismos, para produção de biomassa proteica para fins alimentares.

ARAÚJO et alii (1977) propuseram a utilização de fungos filamentosos, em lugar das leveduras, na fermentação aeróbica da vinhaça, em razão desses fungos apresentarem reduzida sensibilidade às variações de temperatura, pH, aeração, nutrientes e a biomassa micelial ser de fácil separação - em peneiras. Testes de seleção indicou o *Aspergillus oryzae* - ATCC como sendo o fungo que atendia os objetivos do experimento. Nos ensaios, utilizou-se vinhaça de caldo de cana não esterilizada e enriquecida com sais a base de nitrogênio e fósforo. Após um período de fermentação de 72 horas, conseguiu-se a produção de 14,26 g de massa micelial seca por litro de substrato e uma redução da DBO da ordem de 80%. Na etapa seguinte do trabalho, quando foi utilizado fermentadores rústicos com até 250 litros de capacidade, os pesquisadores notaram uma variação nos rendimentos da fermentação devido a contaminações causadas por leveduras e bactérias, que

afetaram seriamente a produção de biomassa fúngica com reflexos na redução da DBO. Para solução desse problema propôs-se o tratamento preliminar da vinhaça com a argila bentonita seguido de uma decantação. Os autores concluíram por fim, ser a fermentação da vinhaça com fungos filamentosos um tratamento associado, e não definitivo, quando se busca eliminar sua carga poluente.

Visando eliminar elementos inibidores do crescimento de leveduras em vinhaça, TAUK (1978) tratou o efluente com ácidos minerais. Utilizou HCl, H₂SO₄ e HNO₃ na base de 5 ml de ácido concentrado por 100 ml de vinhaça. Após decantação foi separado o precipitado do sobrenadante. A vinhaça - pura e tratada - foi adicionada a meio de melação a 3% na proporção de 25, 50, 75 e 100%. Os resultados experimentais mostraram que quando se utilizou a vinhaça a 100% como substrato, a levedura assimilou açúcares (88-89%) independentemente do tratamento com os ácidos minerais. Os melhores resultados para produção de biomassa seca (15,5 g/l) e proteína bruta (46,8%) foi conseguido com vinhaça tratada com HNO₃, em mistura de partes iguais com o meio de melação.

Com o objetivo de aumentar a produção de células de leveduras e a sua riqueza em proteínas, TAUK e GAMBALE (1978) utilizaram culturas mistas do gênero *Candida* para fermentar vinhaça suplementada com H₃PO₄. As espécies utilizadas foram: *C. utilis*; *C. tropicalis*; *C. solani*; *C. javanica*; *C. brumpti*. Os tratamentos foram três 1 - culturas puras em

vinhaça; 2 - culturas mistas usando-se combinações de duas espécies, em vinhaça e 3 - culturas mistas em vinhaça suplementada com H_3PO_4 0,05%. Em cultura pura fermentando vinhaça, a *C. javanica* apresentou maior produção de biomassa (5,4 g/l), a *C. utilis* a maior percentagem de proteína bruta na biomassa (45,8%) e a *C. tropicalis* a produção final de proteína bruta mais alta (1,71 g/l). Quando se associou as leveduras em culturas mistas para fermentar a vinhaça não suplementada verificou-se uma queda da produção de biomassa seca (1,69 a 2,30 g/l) e da sua riqueza em compostos nitrogenados (22,7 a 35,6%). O contrário aconteceu, porém, quando as culturas mistas fermentaram vinhaça suplementada com H_3PO_4 . Neste caso a combinação *C. solani* com *C. tropicalis* apresentou os melhores resultados quanto à produção de massa celular (4,89 g/l) e proteína bruta (2,29 g/l), sendo que a combinação *C. brumpti* com *C. utilis* teve biomassa mais rica em proteína bruta (49,0%). Os autores concluíram que nem sempre se tem a maior produção de biomassa e proteína numa mesma cultura.

MARTELLI e SOUSA (1978) estudaram a bioconversão da matéria orgânica da vinhaça em biomassa de *Candida utilis*, como meio de reduzir o poder poluente desse efluente; razão pela qual, a vinhaça foi apenas decantada não recebendo qualquer suplementação. Os resultados mostraram que 50% da proteína e da matéria redutora da vinhaça foi consumida pela levedura. Os ácidos aminados e açúcares redutores desaparecem

após a fermentação. As autoras verificaram que a quantidade de carbono, nitrogênio e fósforo presentes na vinhaça é suficiente em relação ao material fermentável, uma vez que não foram totalmente consumidos. As autoras concluíram, finalmente, que a produtividade média em células não recomenda a utilização da vinhaça "in natura" como substrato para produção de biomassa alimentar de *Candida utilis* e que a despoluição do efluente é limitada obrigando-se a prever um tratamento adicional para o mosto final.

Dando sequência a trabalho realizado anteriormente, ARAÚJO et alii (1978) estudaram a influência do pré-tratamento da vinhaça, com argila bentonita, como forma de controlar a contaminação no processo fermentativo. Os experimentos foram realizados em fermentadores com 20 litros de substrato, utilizando como agente fermentador o fungo *Aspergillus oryzae*. Quando se utilizou a vinhaça sem tratamento prévio com bentonita, a fermentação apresentou rendimentos baixos: produção de biomassa 8,3 g/l; assimilação de nitrogênio 16,7% e redução da DBO 25,0%. Já, a fermentação com vinhaça previamente tratada com a argila, mostrou melhores resultados: produção de biomassa 12,6 g/l; assimilação de nitrogênio 74,1% e redução da DBO 82,5%, demonstrando a eficiência da bentonita na eliminação parcial dos contaminantes. Mas, testes realizados na escala de 1.000 litros não apresentaram os mesmos resultados aos de laboratório devido a problemas ocorridos no tratamento prévio da vinhaça (decantação). Nesta

fase de experimentação, os autores concluíram que o refinamento do pré-tratamento da vinhaça torna o processo antieconômico. Recomendaram, assim, a substituição do fungo filamentosso - altamente sensível às contaminações - por leveduras e o aperfeiçoamento de métodos para eliminação dos contaminantes.

Levando em consideração a realidade brasileira, DE LAMO e MENEZES (1978) propuseram estudar a fermentação da vinhaça de forma a evitar os processos assépticos e aqueles que utilizam a centrifugação como meio de separação de biomassa. Os autores trabalharam com o fungo *Aspergillus oryzae* ITAL-18 e vinhaça não esterilizada. Ensaio realizado em agitador rotativo mostraram que o *A. oryzae* cresceu melhor em pH ácido (3,5-4,5) e respondeu positivamente à suplementação do meio com sais de nitrogênio e fósforo - produção de biomassa aumentou de 9,43 g/l em vinhaça para 11,95 g/l em vinhaça enriquecida. A velocidade de rotação do agitador rotativo não interferiu no rendimento da fermentação. Já nos experimentos realizados em fermentadores de 30 litros, onde o pH do meio de vinhaça suplementada foi mantido entre 4,4 e 5,5 e o tempo de fermentação fixado em 72 horas, observou-se que os níveis finais de açúcares redutores, nitrogênio e fósforo ainda eram altos, o que permitiria que a fermentação transcorresse por mais tempo. A redução da DBO foi de 77,5%, mas seu valor final apresentou-se, ainda, bastante elevado (5.780 ppm). A produção de biomassa fúngica e o seu teor de proteína foram satisfatórios: 12,5 g/l e 38,8%, respectivamente.

Os autores concluíram que a vinhaça por ser descartada em altas temperaturas apresenta boas possibilidades de adequação ao tratamento fúngico, mesmo excluindo a fase de esterilização do substrato desse processo.

TAUK (1979a) estudou o desenvolvimento de leveduras em vinhaça, procurando verificar o efeito da suplementação de ácidos e sais e o uso de culturas mistas para aumentar a produção de biomassa e proteína. No estudo de culturas puras (*Rhodotorula glutinis* e *Rh. mucilaginoso*), a autora trabalhou com meios à base de vinhaça pura ou suplementada com meloço, sais (sulfatos de amônio, magnésio e potássio, fosfato de sódio e uréia) e ácidos (gliberélico e fosfórico). Em culturas mistas (combinações de espécies de *Rhodotorula* e *Candida*) utilizou vinhaça pura e suplementada com H_3PO_4 . Os resultados mostraram que em cultura pura os microrganismos assimilaram mais eficientemente os açúcares redutores da vinhaça em relação àquela suplementada. A produção de biomassa foi superior quando houve suplementação, principalmente com ácido gliberélico ou sulfato de amônio para *Rh. glutinis* e com ácido fosfórico para *Rh. mucilaginoso*. Já em culturas mistas, verificou-se que a vinhaça suplementada com H_3PO_4 apresentou melhores resultados para produção de biomassa e teor de proteína na massa celular e consumo de açúcares redutores. A combinação *Rh. glutinis* com *Candida krusei* mostrou-se a mais vantajosa em relação às demais.

Em trabalho teórico, CAMHI (1979) reconheceu

ser a vinhaça fonte de nutrientes para fermentação com a levedura *Torula utilis* e outros microrganismos tais como, fungos e bactérias visando a produção de proteína unicelular. Afirmou que o efluente é deficiente em fósforo e nitrogênio, sendo, portanto, necessário a sua suplementação com sais de amônio e fosfatos. O autor fixou os parâmetros para fermentação de vinhaça com leveduras: mosto esterilizado, resfriado, enriquecido e diluído a 4-5^o Brix; aeração contínua de aproximadamente 1 volume de ar/volume de mosto/minuto e temperatura controlada de 28 a 32^oC. Nestas condições o efluente depois de fermentado, centrifugado, lavado e seco, darã origem a um produto com 8-10% de umidade, rico em proteínas (45 a 50%), contendo aminoácidos essenciais e vitaminas, constituindo-se em alimento humano (se de alta pureza) ou em componente de ração animal. Finalizando, o autor afirma que para vinhaça com 5^o Brix, é possível atingir um rendimento de 8,4 g/litro de efluente tratado.

Com a finalidade de melhorar o aproveitamento da vinhaça por leveduras, TAUK (1979b) estudou a adaptação desses microrganismos à vinhaça e vinhaça suplementada com melaço. Nos testes foram utilizadas onze espécies de *Candida* e uma de *Torula*. Os meios de cultura apresentavam composição com teor crescente de vinhaça (0; 25; 50; 75 e 100%) em relação ao meio de melação a 3%. Inoculou-se inicialmente o meio de melação (vinhaça 0%), que apôs a fermentação serviu como fonte de inóculo (10 ml) para o meio de vinhaça 25% e assim

sucessivamente até o meio de vinhaça 100%, fechando a primeira etapa. O experimento contou com 5 etapas sucessivas. Verificou-se que durante o processo houve aumento da produção de biomassa para as culturas de *C. utilis*, *C. intermedia* e *C. tropicalis*. O mesmo aconteceu para *C. robusta* e *C. stellatoidea* quando cresciam em meio de vinhaça 100%. Para as demais leveduras houve flutuação (*C. brumpti*; *C. pseudotropicalis*; *C. javanica*) na produção de biomassa ou até mesmo uma "adaptação negativa" (*C. parapsilosis*; *C. krusei*; *C. melinii*), tendo a produção de massa celular diminuído com o processo de culturas sucessivas. As leveduras que melhor assimilaram açúcares redutores (acima de 80%) em meio de vinhaça foram *C. intermedia* e *C. robusta*. No final do processo, a produção de *C. utilis* no meio de vinhaça alcançou 12,9 g/l, superior, portanto, a resultados citados pela literatura. A autora concluiu que o método não pode ser entendido como adequado para o preparo do inóculo devido ao tempo necessário à sua execução - cerca de 32 dias - mas demonstra a adaptabilidade de certas leveduras ao meio contendo melão e/ou vinhaça.

ANGELIS et alii (1979) estudaram o desempenho de leveduras, em culturas puras e mistas, na fermentação de vinhaça suplementada com ácido e sais minerais. Nos testes, utilizaram as espécies *Candida utilis*, *C. lipolytica*, *Rhodotoryla glutinis* e *Torula utilis*. A suplementação foi feita com sulfatos de potássio, magnésio e amônio, uréia, ácido fosfórico e melão. Os autores verificaram uma maior aptidão das

culturas mistas em produzir biomassa (3,5 a 5,6 g/l), sendo que os meios suplementados com ácido fosfórico e sais minerais forneceram os melhores resultados. Já as culturas puras produziram células com maiores teores de proteína bruta (33,1 a 38,5%), principalmente quando desenvolvidas em meios pobres (meio mínimo mineral e vinhaça) e vinhaça suplementada com sais de nitrogênio.

Objetivando o incremento da produção de células e proteína de leveduras do gênero *Candida* a partir da fermentação de vinhaça, GAMBALE (1980) suplementou o efluente com doses crescentes de K_2SO_4 . Nos testes foram utilizadas as espécies *C. membranaefaciens*, *C. krusei*, *C. stellatoidea*, *C. solani* e *C. macedoniensis*. Os resultados mostraram que o sulfato de potássio não alterou a produção de massa seca e proteína das leveduras utilizadas, com exceção da espécie *C. macedoniensis*.

Estudo de adaptação da levedura *Candida solani* em substratos de vinhaça, foi realizado por TAUKE em 1981. Nesse mesmo trabalho, a autora estudou o desenvolvimento de *C. solani*, *C. utilis* e *C. tropicalis* em culturas puras e mista (*C. solani* - *C. tropicalis*), a partir de meios de vinhaça suplementados com sais e ácidos. A levedura *C. solani* não apresentou qualquer grau de adaptabilidade em meios contendo vinhaça. Em cultura pura, a levedura *C. utilis* apresentou os melhores resultados para a produção de biomassa e proteína; a produção máxima foi obtida com meio de vinhaça suplementada

com uréia e H_3PO_4 . A associação *C. solani* - *C. tropicalis*, apresentou produção de biomassa e de proteína maior que as respectivas culturas puras. A adição de Na_2HPO_4 aumentou a produção de massa celular nos diferentes cultivos. Embora o potássio seja o elemento mineral em maior concentração na vinhaça, o tratamento com K_2SO_4 apresentou os melhores resultados de produção de biomassa e proteína para cultura pura de *C. solani* e produção de proteína na cultura mista. A autora concluiu, por fim, que a levedura *C. utilis* é superior à *C. solani* na capacidade de produzir proteína microbiana a partir de vinhaça.

KIYAN et alii (1982) estudaram o emprego de leveduras em culturas puras e mistas na fermentação de vinhaça de mandioca. Utilizou-se as espécies *Candida utilis*, *C. lipolytica*, *Rhodotorula glutinis* e *Torula utilis* em culturas simples ou em combinações duplas, tripla e quádrupla. Como substrato foi usado sobrenadante da vinhaça de mandioca centrifugada, puro ou suplementado com melão, $(NH_4)_2SO_4$, $MgSO_4$, uréia e $(NH_4)_2HPO_4$. Os autores verificaram que o teor de cianeto não interferiu na produção de biomassa pelas leveduras, e que as culturas mistas mostraram-se mais eficientes na produção de massa celular, em relação às culturas puras.

Visando equilibrar nutricionalmente a vinhaça para a produção de biomassa da levedura *Rhodotorula gracilis*, SRUR e AQUARONE (1983) suplementaram-na com "Amiferm", resíduo da fermentação glutâmica. O substrato para fermentação

foi constituído de 18 litros de vinhaça para 2 litros de Ami
ferm. Os autores verificaram uma redução global na composi
ção do efluente favorecendo a sua depuração, e tornando-o me
nos poluidor. Embora o resíduo da fermentação apresentasse
uma apreciável redução da DBO, esta continuou alta, em torno
de 7.000 ppm; bem acima, portanto, do valor máximo permitido
pela legislação - 60 ppm, para o descarte em cursos d'água.
Segundo os autores, tal limite poderá ser ultrapassado caso o
efluente sofra tratamento que reduza a sua carga poluido
ra - DBO - em mais de 80%.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Vinhaça

Utilizou-se, nos experimentos, vinhaça coletada na Usina Santa Helena, localizada no município de Piracicaba - SP, em setembro de 1981. O efluente proveio da fermentação de mosto misto (18-22⁰BRIX) e foi retirado da base da coluna de destilação A, à temperatura de 100-105⁰C. Em seguida, foi transportado ao Departamento de Tecnologia Rural - ESALQ - USP, onde, depois de fracionado para frascos erlenmeyer de 1, 2 e 5 litros sofreu esterilização em autoclave, na pressão de 1 atmosfera por 20 minutos. Após resfriamento, os frascos de vinhaça esterilizados foram estocados em geladeira a 4⁰C, para posterior utilização.

3.1.2. Microrganismo

Pelas razões expostas por ARAÚJO et alii (1977) e DE LAIO e MENEZES (1978), optou-se pela utilização de um fungo filamentoso para fermentar a vinhaça. Nos ensaios de seleção utilizou-se *Aspergillus niger* IZ-9 e *Aspergillus oryzae* ITAL-18 para fermentar meio de cultura composto de meio líquido completo para *Aspergillus* substituído em doses crescentes com vinhaça. O *Aspergillus oryzae* ITAL-18 foi escolhido por apresentar maior eficiência e regularidade na produção de biomassa.

3.2. Métodos

3.2.1. Preparo dos Meios de Cultura

Utilizou-se nos testes os seguintes meios de cultivo:

- a) Vinhaça;
- b) Vinhaça isenta de sólidos em suspensão;
- c) Flegmaça
- d) Flegmaça substituída progressivamente por vinhaça;
- e) Meio mínimo;

- f) Meio mínimo substituído progressivamente por vinhaça;
- g) Meio completo;
- h) Meio completo substituído progressivamente por vinhaça;
- i) Vinhaça corrigida para diferentes valores de pH.

Os meios de cultura a que se referem os itens a, b, e, f, g, h, tiveram seus valores de pH corrigidos para 5,0 através do uso de NaOH 1,0 N ou HCl 1,0 N. Utilizou-se essas mesmas drogas para a correção dos valores de pH do meio a que se refere o item i. A vinhaça apresentou pH inicial de 4,9.

O meio de cultivo do item b foi o sobrenadante obtido pela centrifugação da vinhaça a 2.000 rpm/10 min.

Os meios de cultura, depois de preparados, foram esterilizados em autoclave, na pressão de 1,0 atmosfera por 20 minutos.

A composição do meio completo, segundo PONTE CORVO et alii (1953), modificado por CHRISTIAS et alii (1975), está relacionada a seguir.

Composição do Meio Completo:

Glucose	10,00 g
NaNO ₃	6,00 g
KH ₂ PO ₄	1,52 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,52 g
KCl	0,52 g
Peptona	2,00 g
Extrato de levedura	0,50 g
Ácido nucleico	0,50 g
Ácido casaminado	3,00 g
Água destilada	1.000 ml
pH	5,0

OBSERVAÇÃO: Para meio completo sólido, adiciona-se 20,0 g de agar.

A composição do meio mínimo, segundo PONTECORVO et alii (1952), está abaixo relacionada.

Composição do Meio Mínimo:

Glucose	10,00 g
NaNO ₃	6,00 g
KH ₂ PO ₄	1,52 g
KCl	0,52 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,52 g
Traços	Segundo LILLY e BARNETT (1951)
Água	1.000 ml
pH	5,0

A composição e preparo da solução traços, segundo LILLY e BARNETT (1951), está abaixo relacionada. se

Composição e Preparo da Solução Traços:

$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	0,7235 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,4298 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,2030 g

Dissolve-se os sais em 600 ml de água destilada e adiciona-se H_2SO_4 até a solução tornar-se clara. Em seguida, completa-se o volume para 1.000 ml. Utiliza-se 2,0 ml desta solução por litro de meio mínimo.

3.2.2. Preparo do Inóculo

Durante a realização dos ensaios, manteve-se o *Aspergillus oryzae* crescendo em meio completo sólido em enlermeyer de 500 ml. A incubação era feita em estufa na temperatura de 30°C. A repicagem, feita semanalmente, coincidia com os trabalhos de inoculação do fungo nos meios de cultura em estudo. Para tanto, adicionava-se 200 ml de uma solução de Tween 10^{-4} à cultura esporulada e com auxílio de um bastão esterilizado liberava-se os esporos para o meio, formando uma suspensão. A contagem em câmara de Neubauer revelou que a riqueza dessa suspensão estava na ordem de $0,5-2,0 \cdot 10^7$ esporos/ml. A quantidade de inóculo utilizada nos experimentos

foi de 5% (5 ml de suspensão de esporo/100 ml de meio).

3.2.3. Parâmetros da Fermentação

As fermentações foram realizadas em frascos erlenmeyer de 250 ml contendo 100 ml de meio de cultura. Os meios foram submetidos a agitação de 100 rpm em agitador rotativo à temperatura de 30⁰C, por 72 horas.

No experimento em que se estudou a influência da relação volume do frasco/volume de meio na produção de biomassa e proteína fúngica, utilizou-se - em frascos de 250 ml - quantidades decrescentes de volume de substratos; de tal forma que a relação entre o volume do frasco e volume de meio resultasse nas seguintes proporções: 2,5/1; 5,0/1; 7,5/1; 10,0/1; 12,5/1.

Os resultados apresentados neste trabalho representam a média aritmética dos valores obtidos de frascos de fermentação em triplicata.

3.2.4. Separação e Secagem da Biomassa

A biomassa fúngica foi separada do meio fermentado por filtração à vácuo, utilizando o papel de filtro Whatman nº 1. O resíduo líquido teve seu pH determinado em potenciômetro medidor de pH. A massa micelial, por sua vez, foi secada em estufa à temperatura de 70⁰C por 72 horas.

3.2.5. Determinação de Nitrogênio Total e Proteína Bruta

O nível de nitrogênio total na biomassa seca foi determinado pelo método micro Kjeldahl, segundo BAILEY (1967). Calculou-se o teor de proteína bruta no micélio multiplicando-se os valores encontrados para nitrogênio total pelo fator 6,25.

3.2.6. Determinação da Demanda Bioquímica de Oxigênio - DBO_5

Esta análise foi realizada no ensaio de produção de biomassa em função do tempo de fermentação, utilizando vinhaça como meio de cultura, sob condição padrão de cultivo. A DBO_5 foi determinada no líquido residual da fermentação da vinhaça, segundo método proposto por HAUSLER Jr. (1971).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Produção de Biomassa e Proteína de *A. oryzae* em Meio de Flegmaça, Flegmaça Substituída por Vinhaça em Doses Crescentes e Meio de Vinhaça

Em meio de flegmaça (0% de vinhaça) houve apenas traços de crescimento submerso, que se apresentaram como minúsculas esferas miceliais, com diâmetro inferior a 0,5 mm. Nos tratamentos com 20 a 40% de vinhaça o *A. oryzae* cresceu na forma de esferas, com diâmetro variando de 2 a 5 mm. Já nos meios contendo 80 a 100% de vinhaça o crescimento do fungo apresentou um aspecto cotonoso e amorfo. Em substrato com 60% de vinhaça, a forma de crescimento foi intermediária entre aquela citadas anteriormente.

Os dados da Tabela 1 e Figura 1 mostram que a produção de biomassa e proteína fúngica cresceu de maneira uniforme em função do aumento da concentração de vinhaça nos meios de cultivo. Já o teor de proteína no micélio caiu: de

30,02% no meio com 20% de vinhaça, para 22,27% em meio de vinhaça. Após o processo fermentativo, o pH do meio de vinhaça aumentou de 4,9 (inicial) para 7,2 (final).

A vinhaça utilizada pura, sem qualquer tipo de enriquecimento, forneceu nutrientes orgânicos e minerais, que permitiram a produção de 10,34 g de biomassa e 2,30 g de proteína fúngica, por litro de efluente fermentado. Esse nível de produção é superior àqueles apresentados nos trabalhos de SERZEDELLO et alii (1970), que utilizaram levedura (*Torula*) para fermentar vinhaça suplementada com di-amônio fosfato, glicose e resíduo de vinhaça autolisado; aos de TAUK (1976), que trabalhou com leveduras do gênero *Candida* para fermentar vinhaça pura (não enriquecida); àqueles apresentados por MARTELLI e SOUSA (1978), que utilizaram *Candida utilis* na fermentação de vinhaça pura; aos de TAUK e GAMBALE (1978), que trabalharam com culturas mistas e puras de leveduras (*Candida*) para fermentar vinhaça suplementada com H_3PO_4 ; aos resultados de TAUK (1979a), que utilizou leveduras em culturas puras (*Rhodotorula*) e mistas (*Rhodotorula* e *Candida*) na fermentação de vinhaça pura e suplementada com melado, ácidos e sais minerais; àqueles apresentados por ANGELIS et alii (1979), que trabalharam em condições semelhantes à TAUK (1979a); aos resultados de GAMBALE (1980), que empregou leveduras do gênero *Candida* para fermentar vinhaça suplementada com K_2SO_4 ; aos de TAUK (1981), que utilizou leveduras (*Candida*) em culturas puras e mistas para fermentar vinhaça pura ou enriquecida com

Tabela 1. Crescimento de *A. oryzae* em Meio de Flegmaça, Meios de Flegmaça Substituída Progressivamente por Vinhaça e Meio de Vinhaça.

Substrato % de Vinhaça	Produção de Biomassa g/l	Teor de Proteína %	Produção de Proteína g/l	pH Final
0	traços de cresc.	-	-	7,00
20	1,57	30,02	0,47	7,61
40	3,67	22,53	0,83	7,53
60	6,05	20,84	1,26	7,37
80	8,65	22,08	1,91	7,27
100	10,34	22,27	2,30	7,21

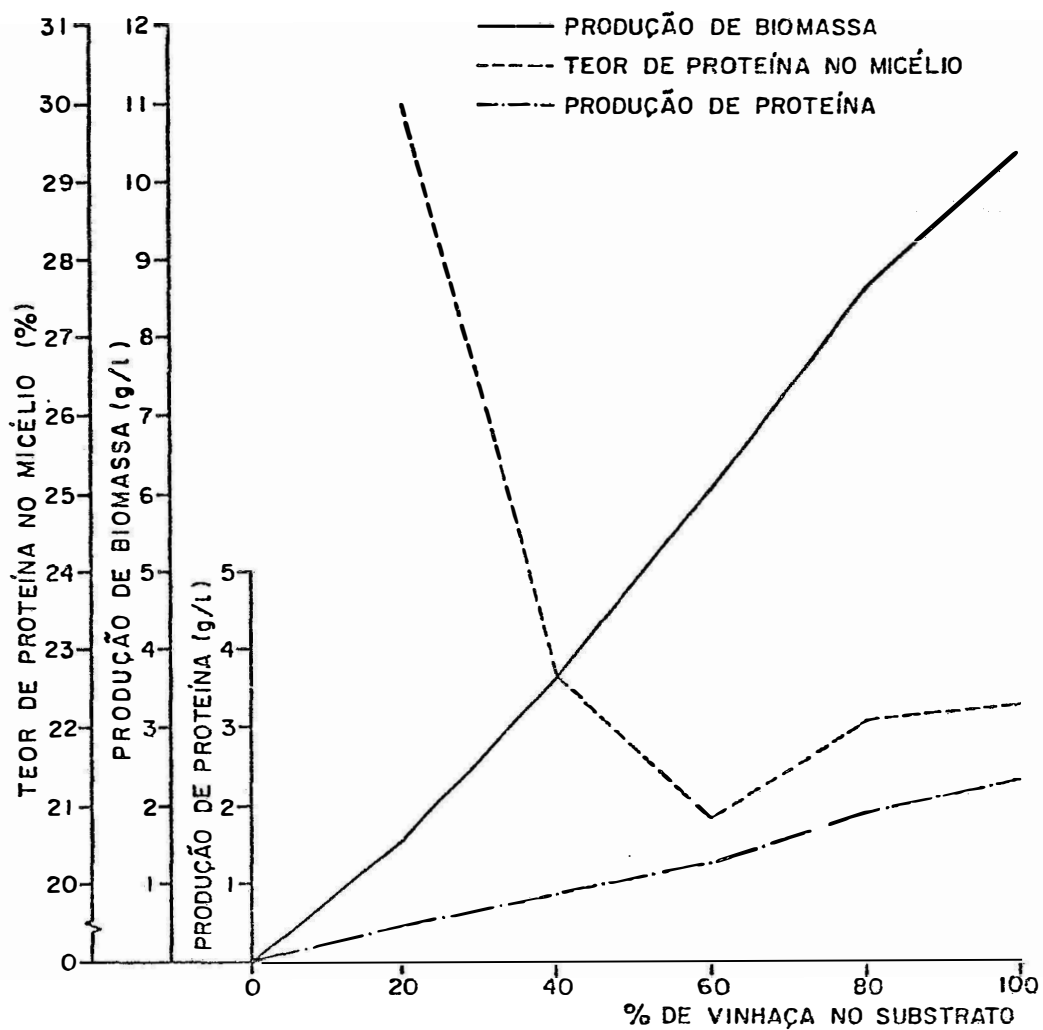


Figura 1. Crescimento de *A. oryzae* em Meio de Flegmaça, Meios de Flegmaça Substituída Progressivamente por Vinhaça e Meio de Vinhaça.

melaço, ácidos e sais minerais; e aqueles apresentados por KIYAN et alii (1982), que empregaram leveduras (*Candida*, *Rhodo*
dotorula e *Torula*) em culturas puras e mistas na fermentação do sobrenadante da vinhaça de mandioca centrifugada, pura ou enriquecida com melaço e sais minerais. Com exceção de MARTELLI e SOUSA (1978) que trabalharam com fermentador, todos os demais autores realizaram seus experimentos em agitadores rotativos.

Por outro lado, o rendimento na produção de biomassa fúngica do presente ensaio está em acordo com os dados apresentados por DE LAMO e MENEZES (1978). Estes autores, utilizando o fungo *A. oryzae* na fermentação de vinhaça pura e não esterilizada, em agitador rotativo, obtiveram a produção de 9,44 g/l; quando fermentaram vinhaça suplementada com sais de fósforo e nitrogênio o rendimento elevou-se para 11,95 g/l. Já ARAÚJO et alii (1977), trabalhando com o mesmo fungo para fermentar vinhaça enriquecida (fósforo e nitrogênio) e não esterilizada, em fermentador de 14 litros, conseguiram a produção de 14,26 g de biomassa fúngica por litro de vinho fermentado. Apenas TAUKE (1979b) e SRUR e AQUARONE (1983) conseguiram produzir biomassa de leveduras a partir de vinhaça (12 g/l) em níveis comparáveis com a produção obtida no presente teste. A primeira autora conseguiu esse nível de produção após 32 dias de adaptação da levedura *Candida utilis* ao meio de vinhaça, utilizando agitador rotativo; enquanto que os segundos, desenvolvendo a levedura *C. gracilis* em vinhaça

suplementada com Amiferm a 10%.

Os resultados apresentados anteriormente mostram que a utilização do fungo filamentoso *A. oryzae* é vantajosa em relação à de levedura, no que diz respeito à produção de biomassa microbiana, levando-se em consideração as condições experimentais em que foram realizados os testes.

A flegmaça, por ser constituída basicamente de água, influiu negativamente no rendimento das fermentações, pois comportou-se como um fator de diluição dos nutrientes presentes na vinhaça. Sob esse ponto de vista, a Figura 1 e os dados da Tabela 1 mostram que a produção de biomassa e proteína fúngica foi proporcional ao teor de vinhaça presente nos substratos. Essa observação está de acordo com aquelas feitas por FALANGHE (1962). Esse autor mostrou que a produção de biomassa de *Agaricus campestris* e *Boletus indecisus* decrescia à medida em que se aumentava a diluição do meio de vinhaça com água destilada. Observou, também, que os meios diluídos favorecem o crescimento mais rápido dos microrganismos, mas contribuem para uma maior taxa de autólise das hifas; diminuindo, assim, o teor de proteína na biomassa e aumentando a porcentagem de sólidos totais nos meios fermentados. Por outro lado, meios com vinhaça concentrada possibilitaram maior produção de biomassa de *A. campestris* e *B. indecisus*.

Contrariamente, porém, ao que observou FALANGHE (1962), o teor de proteína na biomassa do *A. oryzae* foi mais alto em substrato mais diluído: 30,02% em meio com 20% de

vinhaça e 22,27% em meio de vinhaça.

Outro autor que associou o teor de sólidos e consequentemente, a concentração de nutrientes - aos rendimentos da produção de biomassa de microrganismos a partir da fermentação de vinhaça foi RASOVSKY (1973). Esse autor, estudando a fermentação da vinhaça por leveduras, afirmou que o rendimento na produção de biomassa é de 16,8% sobre o Brix - percentagem de sólidos solúveis - da vinhaça.

Em nenhum dos trabalhos, citados anteriormente, ficou evidenciada a existência de uma concentração máxima de sólidos - solúveis ou totais - na vinhaça, a partir da qual o rendimento na produção de biomassa microbiana começasse a cair. Apenas SERZEDELLO (1962) fixou em 1% o teor máximo de açúcares em vinhaça fermentada por leveduras do gênero *Candida*.

4.2. Produção de Biomassa e Proteína de *A. oryzae* em Meio Mínimo, Meio Mínimo Substituído por Vinhaça em Doses Crescentes e Meio de Vinhaça.

Como no experimento anterior, a forma do crescimento micelial variou em função da composição centesimal do meio de cultivo. Assim, nos meios com até 30% de vinhaça, o fungo cresceu na forma de esferas, com 3 a 5 mm de diâmetro. Nos meios onde a concentração de vinhaça foi igual ou superior a 50%, o crescimento do fungo tomou aspecto cottonoso e

amorfo. A coloração da massa micelial variou progressivamente da branca - no tratamento com 0% de vinhaça - para parda, conforme aumentava o teor de vinhaça nos meios de cultura.

Observando os dados da Tabela 2 e Figura 2, nota-se que houve um incremento progressivo da produção de biomassa fúngica em função do aumento do teor de vinhaça na composição dos meios de cultivo. Um comportamento inverso, entretanto, foi constatado para a percentagem de proteína bruta no micélio. Assim, no meio com 0% de vinhaça - meio mínimo - a produção de biomassa foi mínima (4,35 g/l) e o teor de proteína bruta no micélio, máximo (32,04%); já em meio com 100% de vinhaça, a produção de massa micelial foi máxima (12,69 g/l) e o teor de proteína bruta, mínimo (22,73%). A produção de proteína também aumentou de forma progressiva em função dos tratamentos: de 1,39 g/l em meio mínimo, para 2,88 g/l em vinhaça. Os valores de pH dos resíduos das fermentações mantiveram-se acima de 7,6.

A composição química do meio mínimo e da vinhaça de mosto misto é mostrada na Tabela 3. Observa-se que com exceção dos teores de nitrogênio e fósforo, a vinhaça apresenta maiores níveis dos demais elementos: potássio, em média, duas vezes superior; magnésio, cinco vezes, enxofre, dez; matéria orgânica, três vezes.

ARAÚJO et alii (1977) em análise qualitativa e quantitativa da vinhaça, constataram a presença, em sua fração orgânica, de carboidratos, açúcares redutores, glicero1,

Tabela 2. Crescimento de *A. oryzae* em Meio Mínimo, Meio Míni
mo Substituído Progressivamente por Vinhaça e Meio
de Vinhaça.

Substrato % de Vinhaça	Produção de Biomassa g/l	Teor de Proteína %	Produção de Proteína g/l	pH Final
0	4,35	32,04	1,39	8,07
10	4,92	27,43	1,35	8,33
20	6,17	26,84	1,65	8,25
30	6,82	29,38	2,00	8,24
40	7,57	29,34	2,22	8,15
50	8,57	27,13	2,32	8,08
60	9,74	27,29	2,67	7,99
70	9,96	27,02	2,69	7,84
80	9,24	28,04	2,65	8,13
90	11,47	25,65	2,94	7,68
100	12,69	22,73	2,88	7,61

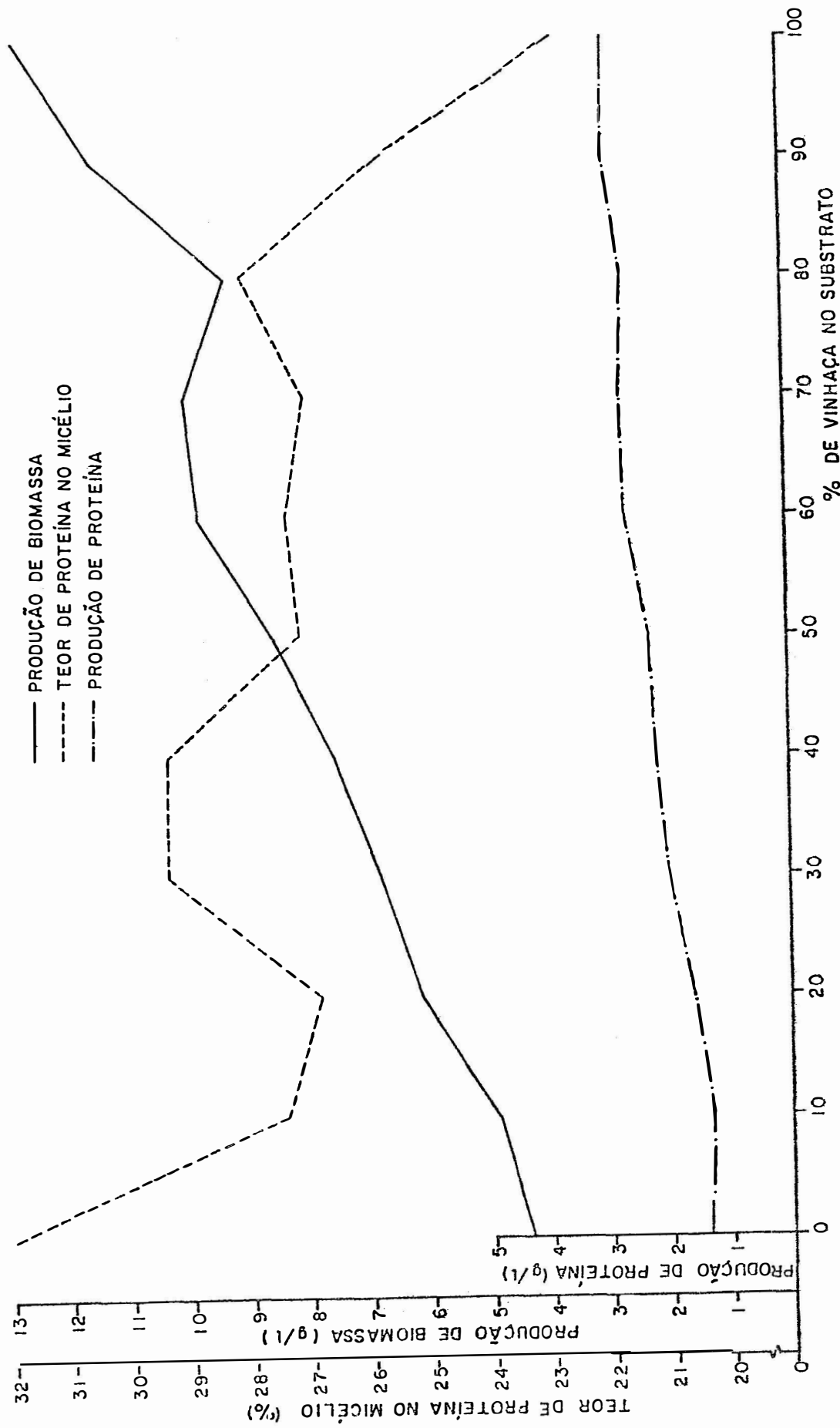


Figura 2. Crescimento de *A. oryzae* em Meio Mínimo, Meio Mínimo Substituído Progressivamente por Vinhaça e Meio de Vinhaça.

Tabela 3. Composição Química do Meio Mínimo e de Vinhaça de Mosto Misto.

Elementos	Meio Mínimo ^{a/} g/l	Vinhaça ^{b/} g/l
Matéria Orgânica	10,00 (glicose)	19,10 - 45,10
Nitrogênio (N)	1,00	0,33 - 0,70
Fósforo (P ₂ O ₅)	1,60	0,09 - 0,61
Potássio (K ₂ O)	1,70	2,18 - 4,59
Magnésio (MgO)	0,10	0,33 - 0,66
Enxofre (SO ₄)	0,20	1,60 - 3,74

a/ Dados calculados a partir da formulação do meio mínimo.

b/ Dados extraídos de GLÓRIA e ORLANDO FILHO (1984).

gomas, fibras, gorduras, ceras e proteína. LIMA (1959), por sua vez, observou a presença de ácidos orgânicos fixos e voláteis. Esse mesmo autor e SERZEDELLO (1970), estudando o resíduo da vinhaça (sólidos em suspensão), notaram a sua riqueza em células mortas de leveduras; sendo que LIMA (1959), observou que o teor desse resíduo em proteína bruta era de 42,69%. MARTELLI e SOUSA (1978), por sua vez, verificaram em ensaios cromatográficos, a presença de açúcares (sacarose e frutose), ácidos orgânicos (succínico), aminoácidos (leucina, isoleucina e valina, principalmente) e outros componentes subprodutos da fermentação alcoólica. A vinhaça segundo definição apresentada por STAINER et alii (1969), por apresentar em sua composição componentes químicos - nutrientes - conhecidos e desconhecidos, pode ser considerada como um meio complexo.

Apesar de apresentar baixos teores de material nitrogenado e fosfatado, o meio de vinhaça permitiu a produção de três vezes mais biomassa e duas vezes mais proteína fúngica, em relação ao meio mínimo; o que evidencia a maior riqueza de vinhaça em nutrientes orgânicos e minerais.

A deficiência da vinhaça em compostos nitrogenados e fosfatados é reconhecida pela maioria dos pesquisadores que a estudaram com finalidade de utilizá-la como fertilizantes ou em processos fermentativos. A suplementação da vinhaça com sais ou ácidos minerais à base de fósforo e nitrogênio resultou em aumento na produção de biomassa e/ou proteína de levedura nos trabalhos realizados por SERZEDELLO et alii

(1970), TAUK (1978), TAUK e GAMBALE (1978), TAUK (1979a), ANGELIS et alii (1979), TAUK (1981) e KIYAN et alii (1982). Também DE LAMO e MENEZES (1978), trabalhando com *A. oryzae*, verificaram que a suplementação da vinhaça com sais de fósforo e nitrogênio resultou num aumento médio de 20% na produção de biomassa do fungo, em relação ao meio de vinhaça não suplementada. Por outro lado, MARTELLI e SOUSA (1978) estudando a composição química da vinhaça - não suplementada - antes e depois de sofrer fermentação por *Candida utilis* notaram que as fontes de carbono, nitrogênio e fósforo não foram totalmente consumidas pelos microrganismos, exceto os açúcares redutores totais e nitrogênio amínico, fazendo crer que a quantidade desses nutrientes é suficiente em relação ao material fermentável presente na vinhaça.

No presente experimento, a produção de biomassa de *A. oryzae* a partir do meio de vinhaça (12,69 g/l) foi semelhante àquela obtida por DE LAMO e MENEZES (1978) - 11,95 g/l - utilizando o mesmo fungo para fermentar vinhaça enriquecida (fósforo e nitrogênio) e sob semelhantes condições de cultivo. Houve semelhança, também, com resultado obtido por ARAÚJO et alii (1978) - 12,60 g/l - quando utilizaram o *A. oryzae* na fermentação de vinhaça não esterilizada e tratada com bentonita, usando, para tal, fermentador de 20 litros.

4.3. Produção de Biomassa e Proteína de *A. oryzae* em Meio Completo, Meio Completo Substituído por Vinhaça em Doses Crescentes e Meio de Vinhaça

Neste experimento o fungo cresceu na forma de esferas, com diâmetro de 3 a 4 mm, nos tratamentos com até 50% de vinhaça. A partir desta concentração, o crescimento micelial tomou aspecto cotonoso e amorfo. Não houve influência da forma de crescimento micelial no processo de separação da biomassa, a partir da vinhaça fermentada, em nenhum dos ensaios. A coloração da massa micelial variou progressivamente da branca para a parda, conforme se aumentava o teor de vinhaça nos meios de cultivo.

Os dados apresentados na Tabela 4 e Figura 3 mostram que a produção de biomassa foi incrementada progressivamente em função do aumento da concentração de vinhaça nos meios de cultura. Passou de 6,12 g/l em meio completo, para 12,82 g/l em meio de vinhaça, representando um aumento de produção da ordem de 100%. Contrariamente, o teor de proteína bruta na biomassa fúngica diminuiu, também, de forma progressiva em função do tratamento realizado. Caiu de 40,32% em meio completo, para 20,70% em vinhaça, representando uma quebra no teor proteico da biomassa fúngica de 50%. Assim, conseqüentemente, houve uma variação muito pequena na produção de proteína entre os tratamentos. Os pH finais dos substratos fermentados permaneceram acima de 7,6.

Tabela 4.

Crescimento de *A. oryzae* em Meio Completo, Meio Completo Substituído Progressivamente por Vinhaça e Meio de Vinhaça.

Substrato % de Vinhaça	Produção de Biomassa g/l	Teor de Proteína %	Produção de Proteína g/l	pH Final
0	6,12	40,32	2,47	7,75
10	6,93	34,76	2,41	7,98
20	7,63	34,74	2,65	8,03
30	8,40	35,17	2,95	8,03
40	8,08	31,87	2,57	8,07
50	8,36	32,60	2,72	8,10
60	9,60	28,89	2,77	7,93
70	10,59	27,09	2,87	7,81
80	9,58	28,17	2,70	8,07
90	11,46	24,74	2,83	7,67
100	12,82	20,70	2,65	7,61

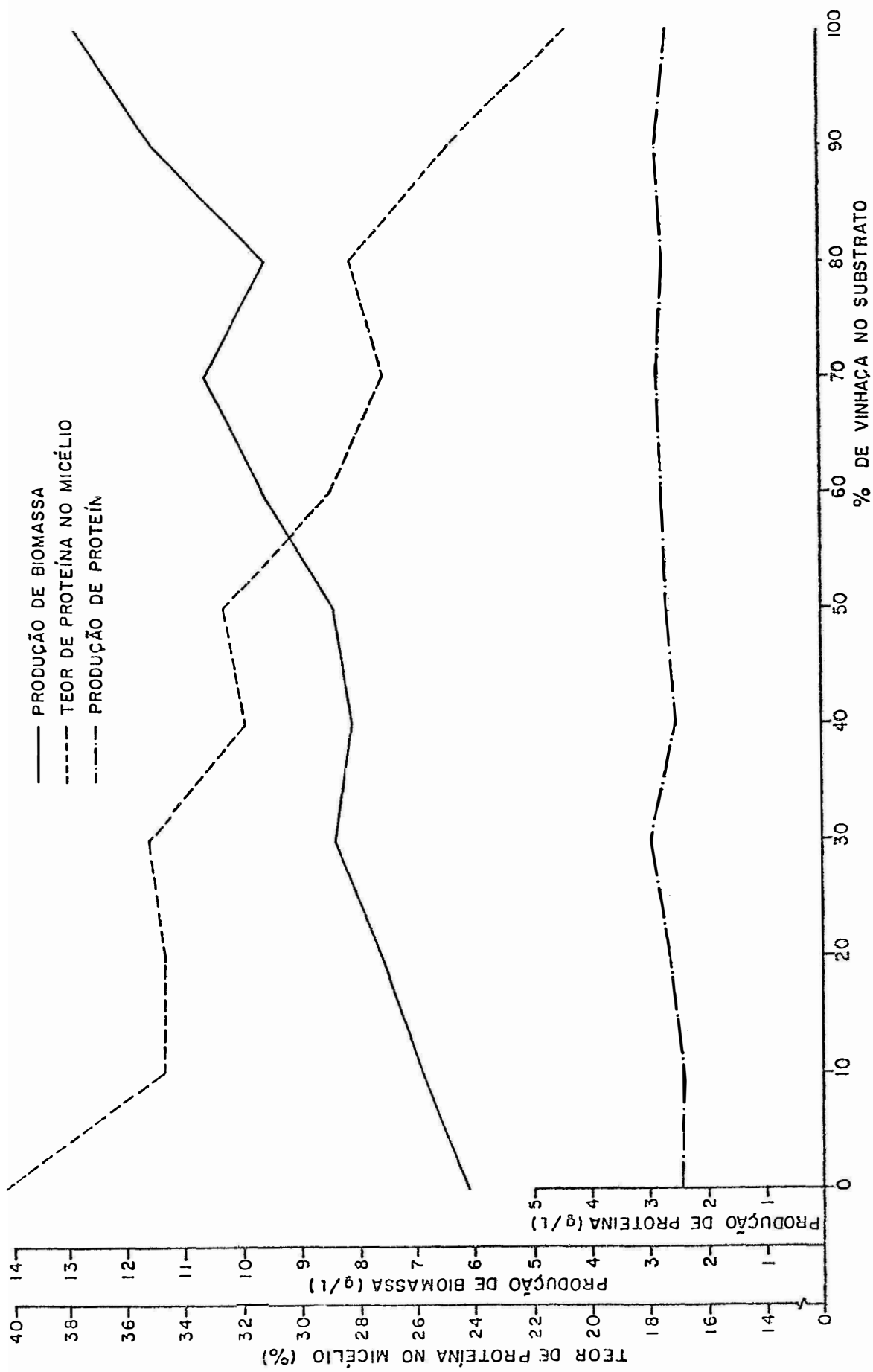


Figura 3. Crescimento de *A. oryzae* em Meio Completo, Meio Completo Substituído Progressivamente por Vinhaça e Meio de Vinhaça.

O meio completo além de ter em sua composição química os elementos utilizados no meio mínimo, apresenta peptona, extrato de levedura, ácido casaminado e ácido nucleico; sendo por isso, considerado um meio complexo. Essa maior riqueza em nutrientes do meio completo fez com que a sua produção de biomassa e proteína de *A. oryzae* fosse maior, quando comparada ao meio mínimo.

A superioridade do meio de vinhaça em relação ao meio completo na produção de biomassa de *A. oryzae*, pode ser explicada pela riqueza em sua composição química de nutrientes orgânicos e minerais, tal como foi observado por LIMA (1959), SEZEDELLO et alii (1970), ARAÚJO et alii (1977), MARTELLI e SOUSA (1978) e GLÓRIA e ORLANDO FILHO (1984).

Vinhaça e meio completo produziram quantidades equivalentes de proteína bruta de *A. oryzae*: 2,65 g/l e 2,47 g/l, respectivamente. É muito provável que o teor de proteína bruta no micélio do fungo desenvolvido em meio de vinhaça, pudesse ser aumentado mediante o enriquecimento deste meio de cultivo com sais minerais à base de fósforo e nitrogênio; o que resultaria num aumento da produção final de proteína bruta.

4.4. Influência da Fração Sólidos em Suspensão da Vinhaça na Produção de Biomassa e Proteína de *A. oryzae*

Neste experimento a forma de crescimento

micelial não foi afetada pela presença ou ausência da fração sólidos em suspensão na vinhaça; tomou em ambos os casos, aspecto cottonoso e amorfo. Os dados da Tabela 5 mostram que o fungo *A. oryzae* crescendo em vinhaça isenta de sólidos em susensão produziu 14% menos biomassa e 37% menos proteína fûngica em relação ao meio de vinhaça.

Ao contrário dos demais experimentos realizados onde o teor de proteína no micélio variou de forma inversa à produção de biomassa, neste caso o teor de proteína foi maior no tratamento em que se verificou uma produção de massa micelial mais alta.

Os resultados encontrados, que evidenciam o efeito benéfico dos sólidos em suspensão da vinhaça na produção de biomassa e proteína fûngica, podem ser explicados, em parte, pelas observações de LIMA (1959) e SERZEDELLO et alii (1970). Entretanto, parte do aumento da produção de biomassa e proteína do *A. oryzae*, observado no tratamento da vinhaça (com sólidos em suspensão), deve ser creditado a interações físicas entre as hifas do micélio e as partículas sólidas presentas no meio de cultivo. Entretanto, é difícil quantificar a contribuição individual dos efeitos da absorção metabólica e da adsorção - dentre outras interações físicas - no aumento de produção observado.

Uma boa parcela dos pesquisadores relatou, em seus trabalhos, terem utilizado nas fermentações, vinhaça centrifugada ou decantada. Dentre eles: LIMA (1959), SERZEDELLO

Tabela 5. Influência da Fração Sólidos em Suspensão de Meios de Vinhaça no Crescimento de *A. oryzae*.

Substrato	Produção de Biomassa g/l	Teor de Proteína %	Produção de Proteína g/l	pH Final
Vinhaça	12,35	20,95	2,57	7,46
Sobrenadante	10,49	17,89	1,88	7,51

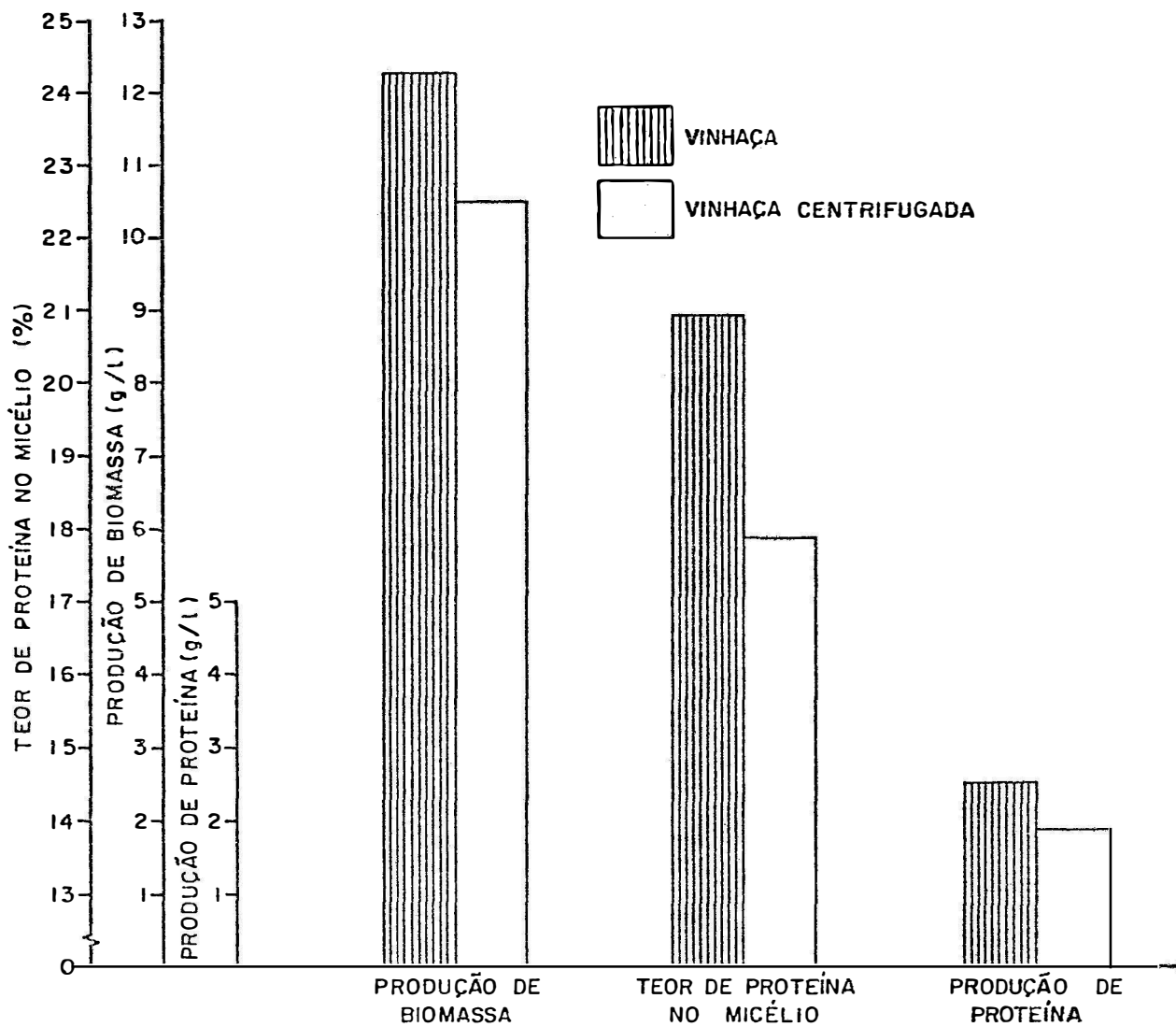


Figura 4. Influência da Fração Sólidos em Suspensão de Meios de Vinhaça no Crescimento de *A. oryzae*.

et alii (1970), TAUK (1978), MARTELLI e SOUSA (1978) e KIYAN et alii (1982) que trabalharam com leveduras; e ARAÚJO et alii (1978) que utilizaram fungo filamentoso. É possível que tal tratamento tenha depreciado a produção de biomassa e/ou proteína microbiana em tais experimentos, em virtude da supressão da fonte de nutrientes representada pelos sólidos em suspensão. Tal fato foi observado, embora de forma limitada, por SERZEDELLO et alii (1970).

4.5. Influência do pH inicial de Meios de Vinhaça na Produção de Biomassa e Proteína de *A. oryzae*

O aspecto do crescimento micelial foi o mesmo daquele já descrito para fermentação em meio de vinhaça. Observa-se, pelos dados apresentados na Tabela 6, que ocorre o crescimento micelial, apenas a partir da vinhaça com pH 4,0. A produção de biomassa foi crescente até o pH 6,0; deste ponto em diante houve uma estabilização. Um comportamento inverso foi constatado para o teor de proteína bruta no micélio, como pode ser observado pela Figura 5. O teor de proteína na biomassa foi mínimo onde sua produção foi máxima: pH 6,0. A produção de proteína bruta manteve-se praticamente constante. Apesar do aumento progressivo dos valores iniciais do pH dos meios de cultivo, os seus valores finais, obtidos após as fermentações, experimentaram apenas um leve incremento; sendo que, com exceção do tratamento pH 4,0, todos os demais

tiveram valores situados na estreita faixa de 7,61 e 7,91.

A forma da curva de produção de biomassa mostrada na Figura 5, está em acordo com as citações de COCHRANE (1958); para quem os fungos apresentam crescimento máximo numa certa faixa de valores de pH de um dado meio de cultura, sendo que, valores extremos - tanto acima como abaixo causam uma queda nesse crescimento. Dessa forma, pode-se prever uma queda de produção de biomassa de *A. oryzae* em meio de vinhaça, a partir de algum valor além do pH inicial 7,0.

A inexistência de crescimento no tratamento pH 3,5 decorre, muito provavelmente, da incapacidade dos esporos do *A. oryzae* em germinarem nesse valor de pH, em meio de vinhaça. Entretanto DE LAMO e MENEZES (1978) relatam a produção de biomassa de *A. oryzae* ITAL-18 (mesma cepa utilizada no presente trabalho) em meio de vinhaça com pH inicial em torno de 3,0. Essa aparente contradição pode ser entendida pelo fato desses autores terem utilizado no inóculo células vegetativas e não os esporos do fungo. Nesse sentido, COCHRANE (1958) afirma que a faixa de um meio de cultivo em que ocorre a germinação de esporos de fungos é mais estreita àquela do crescimento vegetativo.

Para COCHRANE (1958), o aumento do pH observado durante o crescimento de fungos num determinado substrato deve-se à absorção de ânion - dentre eles os ácidos orgânicos - ou produção de amônia a partir de compostos nitrogenados. LIMA (1959), por sua vez, trabalhando com *Candida*

Tabela 6. Influência do pH Inicial de Meios de Vinhaça no Crescimento de *A. oryzae*.

Substrato pH	Produção de Biomassa g/l	Teor de Proteína %	Produção de Proteína g/l	pH Final
3,5	não houve cresc.	-	-	3,57
4,0	9,58	29,40	2,82	6,75
4,5	11,01	26,53	2,92	7,61
5,0	12,37	23,22	2,87	7,77
5,5	13,03	23,62	3,08	7,82
6,0	13,43	21,61	2,90	7,82
6,5	13,11	23,31	3,05	7,88
7,0	13,14	23,79	3,12	7,91

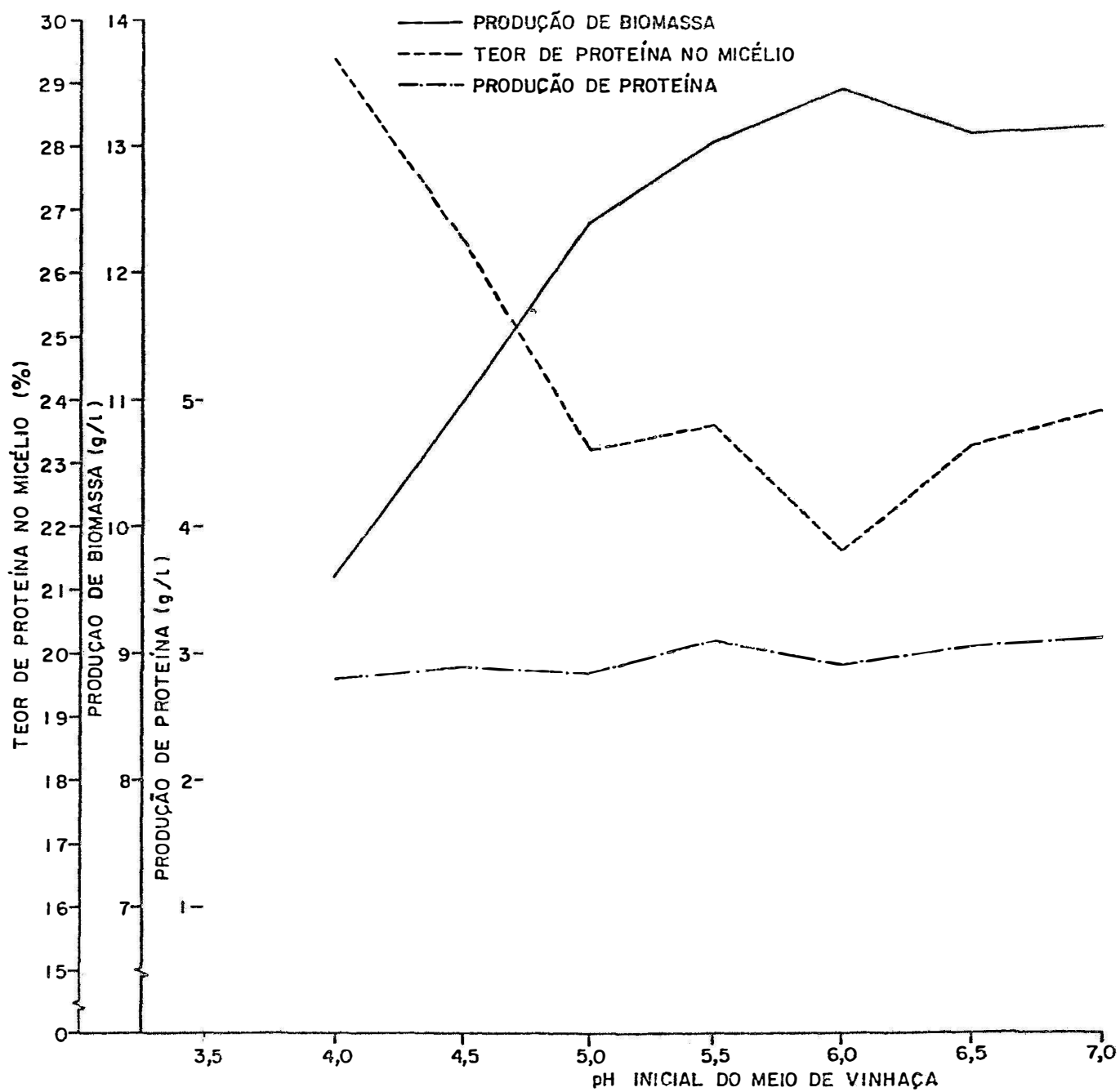


Figura 5. Influência do pH Inicial de Meios de Vinhaça no Crescimento de *A. oryzae*.

utilis na fermentação de vinhaça, observou esse mesmo aumento para o pH do substrato. Esse pesquisador demonstrou que a levedura alimentar consumiu totalmente os ácidos orgânicos voláteis da vinhaça nas primeiras sete horas da fermentação. Tais observações apontam no sentido de que o aumento do pH da vinhaça - fermentada pelo *A. oryzae* - verificado no presente trabalho, seja também devido à assimilação dos ácidos orgânicos por este fungo.

Embora nas condições experimentais do presente trabalho, o *A. oryzae* tenha produzido mais biomassa em meio de vinhaça com pH próximo à neutralidade, os experimentos realizados por DE LAMO e MENEZES (1978) mostraram que para fermentações não assépticas torna-se necessário manter o pH da vinhaça numa faixa ácida, para se evitar o problema das contaminações.

4.6. Influência da Relação VF/VM na Produção de Biomassa e Proteína de *A. oryzae*, em Meio de Vinhaça

Nos tratamentos onde a relação entre o volume do frasco e volume de meio (VF/VM) foi de 2,5:1 e 5,0:1, o fungo apresentou crescimento submerso do tipo cotonoso e amorfo; tal como já foi citado para meios de vinhaça. Entretanto, a partir da relação 7,5:1 houve esporulação crescente do fungo, que apresentou crescimento superficial. Tal crescimento ocorreu nas bordas de contato entre o meio de cultura e as

paredes dos frascos.

Observando os dados da Tabela 7, nota-se que as melhores produções de biomassa - acima de 13 g/l - foram obtidas nos tratamentos 7,5:1 e 10,0:1. Entretanto, nestes tratamentos a percentagem de proteína bruta da biomassa foi mínima. Nota-se, também, que os tratamentos 5,0:1 e 12,5:1 foram equivalentes para a produção de biomassa e proteína. O tratamento 2,5:1, que representou as condições normais de cultivo, apresentou o mais alto teor de proteína na biomassa (24,93%) e a mais alta produção final de proteína bruta (3,04 g/l).

Examinando-se a Figura 6 constata-se a tendência, já antes descrita, da produção de biomassa relacionar-se de forma inversa com a produção de proteína bruta. Essa tendência se manifestou de forma mais clara quando se trabalhou com frascos erlenmeyer de 500 ml. Os resultados desse experimento são mostrados no apêndice deste trabalho.

FREEDMAN (1969) demonstrou que a taxa de absorção de oxigênio por um meio líquido, contido num frasco agitado, é inversamente proporcional ao seu volume; ou seja, menores volumes de meio incorporam proporcionalmente maiores quantidades de oxigênio. Sendo os fungos organismos aeróbicos, esperava-se que a produção de biomassa de *A. oryzae* aumentasse, até um certo ponto, em função do incremento da relação VF/VM. Tal comportamento pode ser observado, embora de maneira grosseira, no experimento em que se utilizou frascos de

Tabela 7.
Influência da Relação VF/VM no Crescimento de *A. oryzae* em Meio de Vinhaça.

Tratamento VF/VM ^{a/}	Produção de Biomassa g/l	Teor de Proteína %	Produção de Proteína g/l	pH Final
2,5:1	12,18	24,93	3,04	7,73
5,0:1	11,61	22,61	2,62	7,93
7,5:1	13,63	21,68	2,96	8,01
10,0:1	13,09	21,11	2,76	8,03
12,5:1	11,63	22,89	2,66	8,22

a/ VF/VM - Volume do Frasco/Volume de Meio.

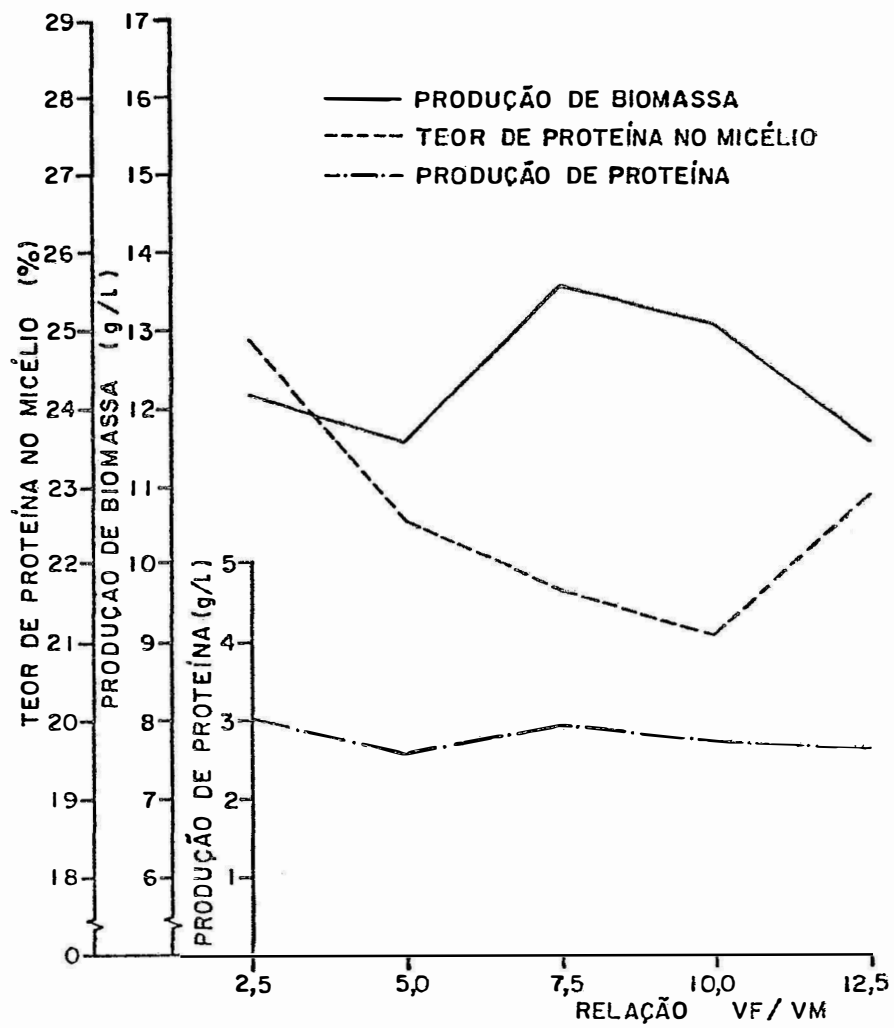


Figura 6. Influência da Relação VF/VM no Crescimento de *A. oryzae* em Meio de Vinhaça.

500 ml. Naquele em que foram usados frascos de 250 ml, houve respostas ao tratamento, mas não da forma esperada. Ao contrário, levando-se em consideração as duas formas de crescimento - submersa e superficial - observada no ensaio, constatou-se que a produção de biomassa caiu quando se aumentou a relação VF/VM.

Resultado também anômalo foi observado por DELANO e MENEZES (1978). Esses pesquisadores não observaram variação na produção de biomassa de *A. oryzae* quando fermentaram meio de vinhaça em frascos agitados com velocidades de 150, 200 e 250 rpm.

Finalizando, os resultados obtidos nos testes com frascos de 250 e 500 ml evidenciaram que altas taxas de aeração influenciaram negativamente na produção de biomassa de *A. oryzae*, uma vez que determinou a mudança da forma de crescimento; de submerso para superficial com produção de esporos, o que não é conveniente para os propósitos deste trabalho.

4.7. Taxa de Redução da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO₅) e Produção de Biomassa e Proteína de *A. oryzae* em Meio de Vinhaça, sob Diferentes Tempos de Fermentação

Este experimento foi realizado nas condições de cultivo citadas no item 3.2.3, sendo que as colheitas de

biomassa fúngica foram feitas em intervalos de 12 horas.

Os resultados experimentais são mostrados na Tabela 8 e 9 e Figura 7. Nota-se que houve crescimento fúngico ou produção crescente de biomassa, até o tempo de 84 horas de fermentação; a partir desse ponto observou-se uma ligeira queda na produção de biomassa. Um comportamento exatamente contrário foi observado para o teor de proteína bruta no micélio. Assim, enquanto *A. oryzae* cresceu, produzindo biomassa, o teor de proteína em seu micélio diminuiu, e quando foi observado queda na produção de biomassa, notou-se um incremento no nível de proteína micelial. Dessa forma, a produção final de proteína bruta praticamente estabilizou-se após 48 horas de fermentação, permanecendo em torno de 2,5 g/l.

Por outro lado, pode-se observar claramente a estreita correlação existente entre a produção de biomassa fúngica e a redução da DBO_5 na vinhaça fermentada. Assim, nos intervalos - 24/36 horas e 48/60 horas - onde houve uma maior velocidade de crescimento do *A. oryzae*, a taxa de redução da DBO_5 foi proporcionalmente mais alta.

COCHRANE (1958) afirmou que fungos filamentosos, cultivados em meios líquidos agitados, apresentam curva de crescimento característica, que são compostas por três fases distintas: crescimento não aparente; crescimento rápido, e autólise. A primeira fase - crescimento não aparente - não está representada na Figura 7 uma vez que a primeira colheita

Tabela 8. Influência do Tempo de fermentação no Crescimento de *A. oryzae* em Meio de Vinhaça.

Tempo de Fermentação Horas	Produção de Biomassa g/l	Teor de Proteína %	Produção de Proteína g/l	pH Final
24	2,23	40,52	1,31	5,49
36	7,42	28,72	2,13	7,16
48	8,74	27,51	2,40	7,23
60	11,79	20,60	2,43	7,66
72	12,64	20,12	2,54	7,47
84	13,38	18,02	2,41	7,12
96	13,04	19,29	2,52	7,18
108	12,71	19,47	2,47	7,38

Tabela 9. Taxa de Redução da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO₅) na Vinhaça Fermentada com *A. oryzae*, em Função do Tempo de Fermentação.

Tempo de Fermentação Horas	DBO ₅ mg/l	Taxa de Redução %
0	14.370,4	-
24	13.296,2	7,48
36	8.944,4	27,76
48	8,185,2	43,04
60	4.240,7	70,49
72	3.425,9	76,16
84	2.888,8	79,90
96	2.629,6	81,70
108	2.240,7	84,41

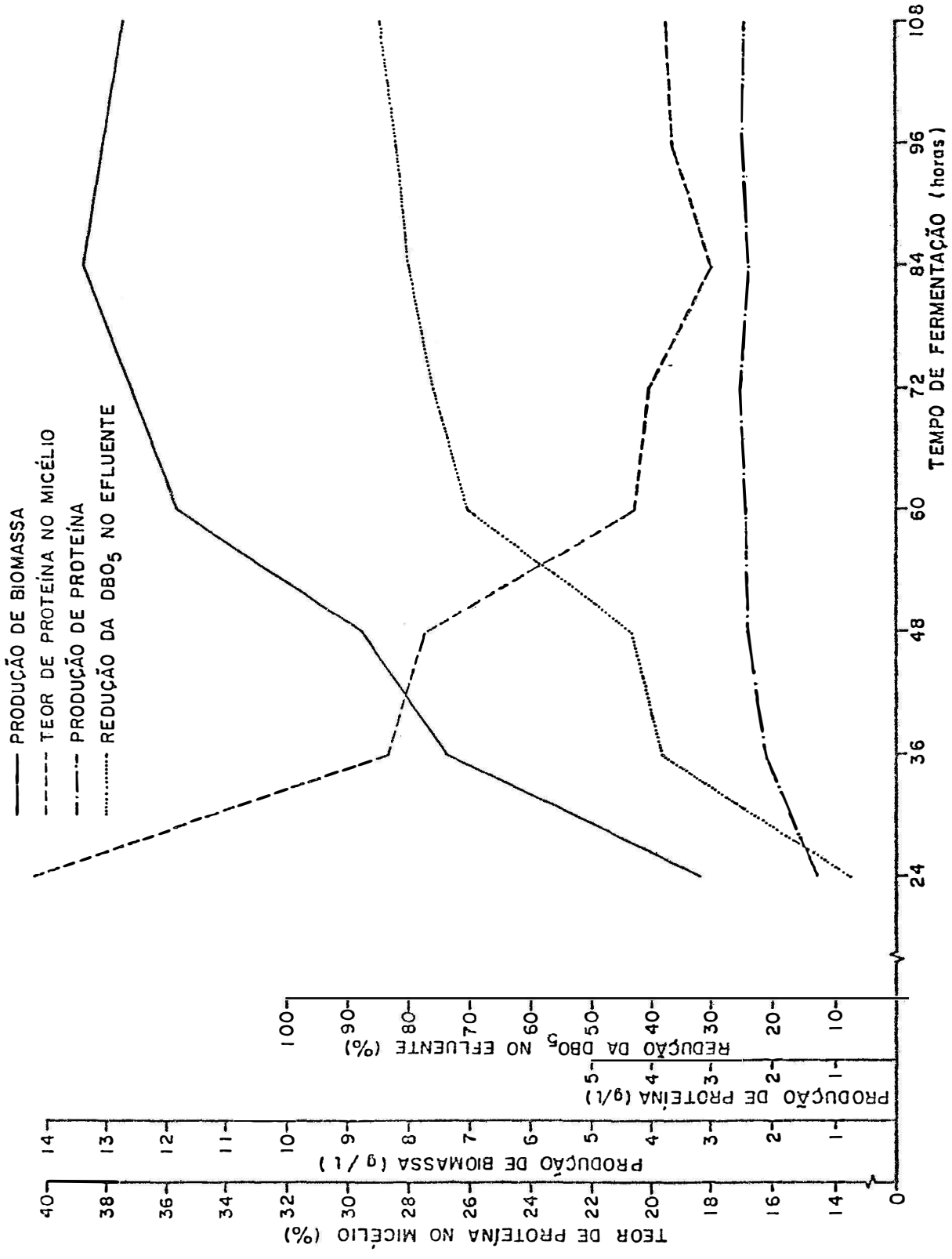


Figura 7. Influência do Tempo de Fermentação na Taxa de Redução da Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO₅) e no Crescimento de *A. oryzae* em Meio de Vinhaça.

de biomassa foi realizada após 24 horas de fermentação. Provavelmente essa fase existiu dentro das primeiras 12 horas de fermentação. A fase do crescimento rápido é visível: ocorreu entre o período de 24 e 60 horas. A partir desse ponto, a velocidade de crescimento declinou, tendendo à estabilização na produção de biomassa.

A redução da produção de biomassa, observada a partir das 84 horas até o final do período experimental, não pode ser atribuída à autólise das hifas do fungo. Prova disto é que não se observou nesse período qualquer queda na taxa de redução da DBO_5 na vinhaça fermentada, como também não se constatou qualquer diminuição na produção final de proteína bruta. Dessa forma, pode-se afirmar que a fase autolítica não ocorreu dentro do tempo experimental de 108 horas. Nesse sentido, DE LAMO e MENEZES (1978) trabalhando em condições semelhantes de fermentação, relataram que não houve ocorrência de lise das hifas de *A. oryzae* dentro do período experimental de 96 horas.

Até o final do tempo experimental - 108 horas - a taxa da DBO_5 foi crescente, atingindo o nível de 84,41%. No tempo padrão em que foram realizados os testes do presente trabalho - 72 horas - a redução da DBO_5 atingiu 76,18%. Esse resultado está próximo àqueles obtidos por ARAÚJO et alii (1977), que trabalharam com fermentador de 14 litros, e DE LAMO e MENEZES, com fermentador de 30 litros; os índices de redução da DBO_5 foram: 79,50% e 77,50%,

respectivamente. Já, SRUR e AQUARONE (1983), trabalhando com levedura, nas condições já discutidas anteriormente, conseguiram uma redução de 74,5%.

Mesmo considerando o período de 108 horas de fermentação, do presente experimento, constata-se que a carga poluente do efluente - vinhaça fermentada - é ainda muito elevada: $DBO_5 = 2.240,7$ mg de O_2/l . A mesma constatação pode também ser feita nos trabalhos citados no parágrafo anterior. Tal fato aponta no sentido de que a vinhaça, após ser fermentada visando a produção de proteína microbiana, deve ainda sofrer tratamento subsequente para diminuir, ainda mais, sua carga poluente, quando se tem por objetivo um posterior descarte nos corpos receptores.

Nos experimentos anteriores, pode-se observar uma correlação negativa entre a produção de biomassa e a porcentagem de proteína bruta no micélio do fungo, fazendo com que a produção final de proteína bruta tendesse para um valor constante. Por outro lado, observando a estreita correlação que existe entre a produção de biomassa e a taxa de redução de DBO_5 , pode-se afirmar que, nos trabalhos de fermentação da vinhaça com *A. oryzae*, deve-se procurar os tratamentos que resultem em maiores rendimentos em biomassa.

OBSERVAÇÃO: Quando se procurou construir a curva de produção de biomassa para meio de vinhaça com pH corrigido para 6,0 e relação VF/VM = 7,5 - tratamentos que apresentaram maior

produção de biomassa fúngica - notou-se, nas fermentações, uma ampla variação, tanto nas formas de crescimento do fungo no substrato quanto na produção de biomassa dentro de cada tratamento; razão pela qual esses resultados não serão considerados.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, foram estabelecidas as seguintes conclusões:

- a) A vinhaça de mosto misto pode ser considerada como substrato para a produção de biomassa e proteína de *A. oryzae*.
- b) A vinhaça não deve sofrer mistura com flegmaça ou qualquer outro efluente que contribua para reduzir a concentração de seus nutrientes.
- c) A vinhaça permitiu a produção de três vezes mais biomassa e duas vezes mais proteína bruta de *A. oryzae* quando comparada ao meio mínimo, demonstrando assim sua maior riqueza em nutrientes.

- d) A vinhaça possibilitou a produção de duas vezes mais biomassa em relação ao meio completo; mas no que diz respeito à produção de proteína bruta, estes dois meios de cultura equivaleram-se.
- e) O teor de vinhaça nos meios de cultivo afetou a forma do crescimento do *A. oryzae*. Meios que apresentaram mais de 50% de vinhaça em sua composição determinaram crescimento fúngico de aspecto amorfo e cotonoso. Em substratos que apresentavam baixos teores de vinhaça em sua composição, o *A. oryzae* cresceu na forma de esferas. A forma de crescimento do fungo não interfere na separação da biomassa.
- f) Os sólidos em suspensão presentes na vinhaça contribuem positivamente na produção de biomassa e proteína bruta de *A. oryzae*; não devendo, por isso, serem separados do substrato.
- g) O fungo *A. oryzae* produziu maior quantidade de biomassa em meio de vinhaça com o pH inicial 6,0.
- h) O processo de fermentação da vinhaça com *A.*

oryzae acarreta aumento nos valores de pH, elevando-os acima do ponto da alcalinidade. Visualiza-se, dessa forma, a necessidade de controle de pH para fermentações não assepticas.

- i) Os valores da relação VF/VM influenciaram na forma de crescimento do *A. oryzae*. Valores crescentes - a partir de 7,5 - da relação VF/VM influenciaram negativamente nos resultados das fermentações, uma vez que determinaram a forma de crescimento superficial, com produção crescente de esporos nos tratamentos. A melhor produção de proteína bruta foi obtida com o menor valor - 2,5 - da relação VF/VM, que representou as condições normais de cultivo.
- j) Constatou-se a existência de uma correlação negativa entre a produção de biomassa de *A. oryzae* e o teor de proteína bruta na mesma.
- l) Observou-se, também, uma estreita correlação entre a taxa de redução da DBO_5 da vinha e a produção de biomassa fúngica.
- m) Após a fermentação, a vinhaça apresentou, ainda, níveis elevados de carga poluente, o

que permite visualizar a necessidade de um tratamento posterior, antes do descarte nos cursos d'água.

- n) Em trabalhos que utilizam a vinhaça como substrato de fermentação para produção de massa micelial de *A. oryzae*, deve-se buscar os tratamentos que possibilitam um maior rendimento em termos de produção de biomassa e, conseqüentemente, maior redução da DBO_5 do efluente, uma vez que a produção de proteína bruta tende para um valor constante.

6. LITERATURA CITADA

ALMEIDA, F.P., 1953. Interferência dos fungos na adubação do solo pela vinhaça. Boletim do Instituto Zimotécnico. Piracicaba, (5):1-9.

ALMEIDA, J.R., 1952. O problema da vinhaça em São Paulo. Boletim do Instituto Zimotécnico. Piracicaba, (3):1-24.

ALMEIDA, J.R., G. RANZANI e O. VALSECCHI, 1952a. A vinhaça na agricultura. Boletim do Instituto Zimotécnico. Piracicaba, (1):11-21.

ALMEIDA, J.R., G. RANZANI e O. VALSECCHI, 1952. O emprego da vinhaça na agricultura. Boletim do Instituto Zimotécnico. Piracicaba, (2):11-16.

ANGELIS, D.F. et alii, 1979. Emprego de leveduras em culturas puras e mistas objetivando o aproveitamento da vinhaça. Brasil Açucareiro. Rio de Janeiro, 94(6):401-406.

- ANÔNIMO, 1981. Onde colocar todo o vinhoto do PROALCOOL. Química e Derivados. São Paulo, 16(184):44-47.
- ANÔNIMO, 1982. Codistil lança "Biostil". STAB - Álcool, açúcar e subprodutos. Piracicaba, 1(1):30-32.
- ARAÚJO, N.Q., Orient., et alii, 1977. Produção de biomassa fúngica do vinhoto. Informativo do INT. Rio de Janeiro, 10(14):12-19.
- ARAÚJO, N.Q., Dir., et alii, 1978. Novas perspectivas para o tratamento microbiológico do vinhoto. Informativo do INT. Rio de Janeiro, 11(19):3-8.
- BAILEY, J.L., 1967. Techniques in protein chemistry. London, Elviesir Publishing Company, p.406.
- BARD, J. e M.P. PAIVA, 1981. Aproveitamento da vinhaça em piscicultura intensiva. SACCHARUM STAB. São Paulo, 4(16):39-40.
- BERTELLI, L.G., 1982. PROALCOOL, a melhor solução às dificuldades energéticas e econômicas nacionais. Brasil Açucareiro. Rio de Janeiro, 100(2):86-100.
- BOTINI, H. e R. SACCONI, 1941. Utilização das caldas de melado. Brasil Açucareiro. Rio de Janeiro, 18(3):222-223.

- CAMARGO, R., 1954. Desenvolvimento da flora microbiana nos solos tratados com vinhaça - análise quantitativa. Boletim do Instituto Zimotécnico. Piracicaba, (9):1-44.
- CAMHI, J.D., 1979. Tratamento do vinhoto subproduto da destilação do álcool. Brasil Açucareiro. Rio de Janeiro, 94 (1):18-23.
- CAMPOS, M.P., 1979. Situação de Campos com relação ao vinhoto. Utilização deste efluente da destilaria na obtenção de gás metano. Brasil Açucareiro. Rio de Janeiro, 93(6): 350-352.
- CAMPOS, M.P. e L.V.F. GONÇALVES, 1981a. Produção de biogás por digestão anaeróbica do vinhoto. Brasil Açucareiro. Rio de Janeiro, 98(1):47-53.
- CAMPOS, M.P. e L.V.F. GONÇALVES, 1981b. Produção de biogás por digestão anaeróbica do vinhoto - 2ª parte. Brasil Açucareiro. Rio de Janeiro, 98(2):103-117.
- CANTARELLI, P.R., 1972. Produção de micélio de cogumelos como fonte de proteína. Piracicaba, 64p. (Tese de Doutorado).
- CHRISTIAS, C., et alii, 1975. Protein content and amino acid composition of certain fungi evaluated for microbial protein production. Applied Microbiology. Baltimore, 29

(2):250-254.

COCHRANE, V.W., 1958. Physiology of fungi. New York, John Wiley, p.524.

DANTAS, B., 1980. Contribuição do setor agropecuário para a solução da crise energética. Brasil Açucareiro. Rio de Janeiro, 95(4):217-231.

DE LAMO, P.R. e T.J.B. MENEZES, 1978. Bioconversão da vinhaça para a produção de biomassa fúngica. Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos. Campinas, 9:281-312.

DIAS, C.A.B., 1981. Perspectiva de tratamento do vinhoto com benefícios ambientais e econômicos - 2ª parte. Brasil Açucareiro. Rio de Janeiro, 97(1):56-67.

EL NAWAWI, A.S. e M.A. FOU DA, 1975. Comparative study on SPC production from molasses, vinesses or bakers yeast effluent. Revista de Microbiologia. São Paulo, 6(2):42-26.

FALANGHE, H., 1962. Production of mushroom mycelium as a protein and fat source in submerged culture in medium of vinesses. Applied Microbiology. Baltimore, 10(6):572-575.

FILGUEIRAS, G., 1941. Demonstração do aproveitamento do vinhoto por pulverização nos gases de combustão. Brasil Açucareiro. Rio de Janeiro, 17(2):124-127.

- FILGUEIRAS, G., 1955. Novo processo para utilização das águas residuais das indústrias Agrícolas. Brasil Açucareiro. Rio de Janeiro, 46(4):496-498.
- FREEDMAN, D., 1969. The shaker in bioengineering. Separata de Process Biochemistry, 4(mar.).
- GAMBALE, V., 1980. Efeito da adição de K_2SO_4 em cultura de levedura em vinhaça. Brasil Açucareiro. Rio de Janeiro, 95(1):35-37.
- GLÓRIA, N. e J. ORLANDO FILHO, 1984a. Aplicação da vinhaça: um resumo e discussões sobre o que foi pesquisado (parte 1). Alcool & Açúcar. São Paulo, 4(14):24-35.
- GLÓRIA, N. e J. ORLANDO FILHO, 1984b. Aplicação da vinhaça: um resumo e discussões sobre o que foi pesquisado (parte 2). Alcool & Açúcar. São Paulo, 4(15):22-27.
- HAUSLER JR., J.W., ed., 1971. Standard methods of the examination of water and waste water. 13ª ed. Washington, American Public Health Association, p.345.
- KIYAN, C. et alii, 1982. Emprego de leveduras em culturas puras e mistas objetivando o aproveitamento de vinhoto de mandioca (I) cultivos no sobrenadante do vinhoto centrifugado. Brasil Açucareiro. Rio de Janeiro, 99(6):404-410.

- LILLY, V.G. e H.L. BARNETT, 1951. Physiology of the fungi. New York, McGraw-Hill Book Company, Inc., p.464.
- LIMA, O.G., 1959. Cultivação de *Candida utilis* em caldas de destilarias de Pernambuco. In: Anais da Escola Superior de Química. Recife, 1(1):67-82.
- MARTELLI, H.L. e N.O. SOUSA, 1978. Obtenção de biomassa de *Candida utilis* crescendo em vinhoto de cana. Revista Brasileira de Tecnologia. Rio de Janeiro, 9(3/4):157-164.
- NICOLAIEWSKY, E., 1981. Tratamento físico-químico do vinho to: floculação, sedimentação e filtração. Brasil Açucareiro. Rio de Janeiro, 98(4):253-260.
- NILSSON, M., 1981. Recuperação de energia a partir dos desperdícios de destilarias. Brasil Açucareiro. Rio de Janeiro, 97(5):288-293.
- ORLANDO FILHO, J., G.M.A. SILVA e E.J.A. LEME, 1983. Utilização agrícola dos resíduos da agroindústria canavieira. In: ORLANDO FILHO, J., Coord. Nutrição e Adubação da cana de açúcar no Brasil. Piracicaba, IAA/PLANALSUCAR, p.229-264.
- PAULA EDUARDO, J.H. e A.I.B. DIAZ, 1983. Novo processo para diminuir a vinhaça. Álcool & Açúcar. São Paulo, 3(13):32-35.

PONTECORVO, G. et alii, 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. Advances in Genetics. New York, 5:142-235.

RASOVSKY, E.M. apud DANTAS, B., 1980. Contribuição do setor agropecuário para a solução da crise energética. Brasil Açucareiro. Rio de Janeiro, 95(4):217-231.

SÃO PAULO. Secretaria da Agricultura. Instituto de Economia Agrícola, 1986. Agricultura: Situação e Perspectiva - 1986/87.

SERZEDELLO, A., 1962. Vinhaça como substrato para a produção de proteína alimentar. III Semana de Fermentação Alcoólica. Piracicaba, 2:303-312.

SERZEDELLO, A. et alii, 1970. Estudo sobre a obtenção de levedura alimentar em substrato de vinhaça. Revista de Agricultura. Piracicaba, 45(1):22-27.

SILVA, G.M.A., 1981a. Tratamento e utilização agroindustrial da vinhaça. Brasil Açucareiro. Rio de Janeiro, 97(6):374-377.

SILVA, G.M.A., 1981b. Tratamento e utilização agroindustrial da vinhaça: um novo enfoque. Brasil Açucareiro. Rio de Janeiro, 98(6):417-422.

SRUR, A.V.O.S. e E. AQUARONE, 1983. Depuração de vinhaça

- pela produção de biomassa de *Rhodotorula gracilis*. STAB - açúcar, álcool e subprodutos. Piracicaba, 2(1):34-37.
- STANIER, R.Y., M. DOUDOROFF e E.A. ADELBERG, 1969. O mundo dos micróbios. São Paulo, Edgard Blucher editora, 741p.
- STUPIELLO, J.P. et alii, 1972. Curso de Destilação - Nível Operacional. São Paulo, COPERSUCAR. 161p.
- TAUK, S.M., 1976. Estudo preliminar da vinhaça como substrato para leveduras. Revista de Microbiologia. São Paulo, 7(4):92-97.
- TAUK, S.M., 1978. Efeito do tratamento com ácidos minerais em vinhaça, no desenvolvimento de *Candida utilis*. Ciência e Cultura. São Paulo, 30(3):350-353.
- TAUK, S.M., 1979a. Desenvolvimento de *Rhodotorula* em vinhaça. Científica. Jaboticabal, 7(2):173-178.
- TAUK, S.M., 1979b. Adaptação de leveduras a vinhaça e vinhaça suplementada com melão. Ciência e Cultura. São Paulo, 31(5):522-530.
- TAUK, S.M., 1981. Estudos dos fatores de crescimento de *Candida solani* em vinhaça. Ciência e Cultura. São Paulo, 33(2):267-273.

TAUK, S.M. e V. GAMBALE, 1978. Efeito da adição de H_3PO_4 em cultura mista de levedura em vinhaça. Brasil Açucareiro. Rio de Janeiro, 91(5):239-244.

VISCONTI, A.G.S. et alii, 1981. Visão atual da problemática do vinhoto e como superá-la. Brasil Açucareiro. Rio de Janeiro, 97(6):394-401.

ZARPELON, F., 1982. Redução do volume de vinhoto. STAB - Açúcar, Álcool e Derivados. Piracicaba, 1(2):28-35.

APÉNDICE

Tabela 10. Influência da Relação VF/VM no Crescimento de *A. oryzae* em Meio de Vinhaça.

Tratamento VM/VF ^{a/}	Produção de Biomassa g/l	Teor de Proteína %	Produção de Proteína g/l	pH Final
2,5	9,19	26,84	2,47	7,35
5,0	9,48	25,43	2,41	7,67
7,5	9,39	22,10	2,08	7,77
10,0	11,01	19,08	2,10	7,99
12,5	10,69	18,77	2,00	8,02

a/ VF/VM - Volume do Frasco/Volume de Meio.

VF = 500 ml

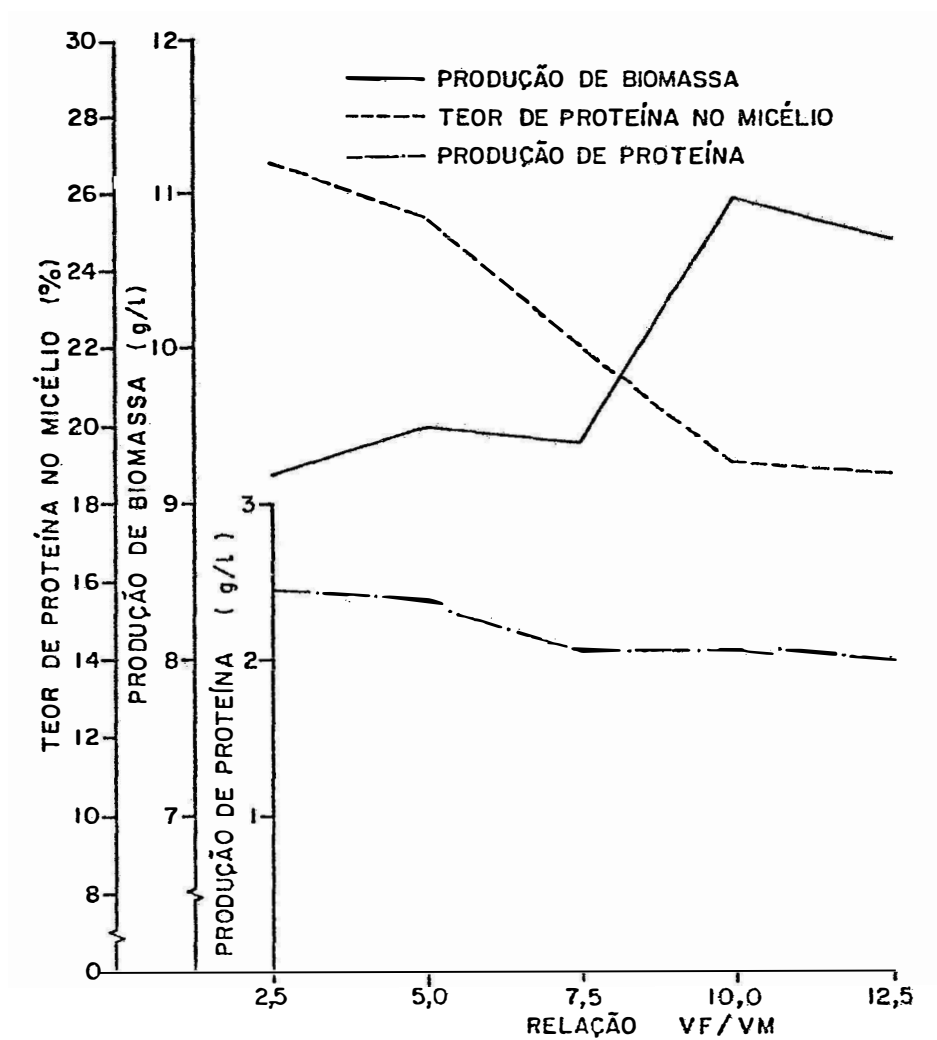


Figura 8. Influência da Relação VF/VM no Crescimento de *A. oryzae* em Meio de Vinhaça.