

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

THAIS CRISTINA CARNEIRO DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO DOS MINERAIS PRESENTES NO LICOR DE MACERAÇÃO
DO MILHO ATRAVÉS DE ANÁLISE EM ICP-OES**

**PONTA GROSSA
2022**

THAIS CRISTINA CARNEIRO DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO DOS MINERAIS PRESENTES NO LICOR DE MACERAÇÃO
DO MILHO ATRAVÉS DE ANÁLISE EM ICP-OES**

**CHARACTERIZATION OF MINERALS PRESENT IN CORN STEEP LIQUOR
THROUGH ANALYSIS IN ICP-OES**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, do Departamento Acadêmico de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

Orientador(a): Prof^a. Dra. Sabrina Ávila Rodrigues

**PONTA GROSSA
2022**



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Esta licença permite download e compartilhamento do trabalho desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es), sem a possibilidade de alterá-lo ou utilizá-lo para fins comerciais. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

THAIS CRISTINA CARNEIRO DOS SANTOS

**CARACTERIZAÇÃO DOS MINERAIS PRESENTES NO LICOR DE MACERAÇÃO
DO MILHO ATRAVÉS DE ANÁLISE EM ICP-OES**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação
apresentado como requisito para obtenção do título de
Bacharel em Engenharia de Bioprocessos e
Biotecnologia da Universidade Tecnológica Federal do
Paraná (UTFPR).

Data de aprovação: 31/maio/2022

Sabrina Ávila Rodrigues
Doutora
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Luis Alberto Chavez Ayala
Mestre
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Mayara Scheffer
Mestre
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

PONTA GROSSA

2022

RESUMO

O licor de maceração de milho é uma matéria-prima amplamente utilizada em diversos processos fermentativos, devido à sua vasta fonte de nutrientes, como carbono, nitrogênio, minerais, vitaminas, aminoácidos e outros compostos presentes no meio. Apesar da grande vantagem da utilização do licor de maceração do milho como matéria prima, há um desafio referente à sazonalidade entre os lotes, a qual está diretamente ligada às diferentes condições e concentrações do produto em diferentes épocas, o que causa uma variação entre processos fermentativos. O objetivo deste trabalho é caracterizar de maneira quantitativa os minerais presentes no licor de maceração do milho através de análise em ICP-OES. Para isso foram coletadas onze amostras de licor ao longo do tempo, dentre o período de 10/01/2022 e 10/03/2022, as quais foram armazenadas até o final da coleta a -20°C e posteriormente analisadas, a fim de demonstrar que há uma variabilidade entre os lotes, que pode impactar significativamente em diferentes processos fermentativos. Os resultados obtidos comprovam que há variação, onde observou-se maior diferença nas concentrações do cálcio, ferro, zinco e vanádio.

Palavras-chave: licor de maceração do milho; minerais; caracterização de matéria prima.

ABSTRACT

Corn steep liquor is a raw material used in several fermentation processes, due to its source of nutrients, such as carbon, nitrogen, minerals, vitamins, amino acids, and other compounds present in the medium. Despite the great advantage of using corn steep liquor as raw material, there is a challenge regarding the seasonality between batches, which is directly related to products' conditions and concentrations in different seasons, which leads to a variation between the fermentation processes. The objective of this work is to characterize in detail the minerals present in the corn steep liquor through the ICP-OES analysis. Therefore, eleven samples of CSL were collected over time, between 01/10/2022 and 03/10/2022. They were stored by the end of collection at -20°C and subsequently analyzed in order to demonstrate that there is variability between batches, which can significantly impact different fermentation processes. The results obtained confirmed variation. The biggest difference was observed in the concentrations of calcium, iron, zinc and vanadium.

Keywords: corn steep liquor; minerals; raw material characterization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Microrganismos aptos para crescimento com licor de maceração de milho.....	11
Figura 1 - Sistema regulatório IRP-IRE.....	20
Figura 2 - Processo de maceração úmida do milho.....	26
Figura 3 - Gráfico de absorção de SO₂ relacionado a produção de Light Steep Water.....	27
Figura 4 - Minerais presentes no SOLULYS®.....	30
Figura 5 - Concentração de células utilizando diferentes substratos.....	31
Figura 6 - Viabilidade celular utilizando diferentes substratos.....	31
Figura 7 - Fluxograma de etapas.....	33
Figura 8 - Esquema simplificado mostrando os princípios operacionais básicos do ICP-OES.....	35
Gráfico 1 - Desvio padrão entre as amostras de licor de maceração de milho.....	37
Figura 9 - Distribuição da concentração de Alumínio, Boro, Cálcio, Cromo, Cobre, Ferro, Potássio e Magnésio em onze amostras de licor de maceração de milho.....	39
Figura 10 - Distribuição da concentração de Manganês, Molibdênio, Sódio, Níquel, Fósforo, Estrôncio, Zinco, Enxofre e Vanádio em onze amostras de licor de maceração de milho.....	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição do licor de maceração do milho.....	10
Tabela 2 – Resultados obtidos por ICP-OES para os minerais analisados.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MW	Mill Water
LSW	Light Steep Water
CSL	Corn Steep Liquor
ICP-OES	Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry
IRP	Iron Regulatory Protein
IRE	Iron Responsive Element
ATP	Adenosine Triphosphate
FBN	Fixação Biológica de Nitrogênio
N	Nitrogênio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	13
2.1	Objetivos gerais.....	13
2.2	Objetivos específicos.....	13
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1	Minerais	14
3.1.1	Alumínio	14
3.1.2	Boro.....	15
3.1.3	Cálcio	16
3.1.4	Cromo.....	17
3.1.5	Cobre.....	17
3.1.6	Ferro.....	18
3.1.7	Potássio.....	20
3.1.8	Magnésio.....	21
3.1.9	Manganês.....	21
3.1.10	Molibdênio	22
3.1.11	Sódio	22
3.1.12	Fósforo	23
3.1.13	Chumbo.....	23
3.1.14	Enxofre	23
3.1.15	Zinco.....	24
3.1.16	Outros minerais	24
3.2	Licor de maceração de milho	24
3.3	Produção de licor de maceração de milho como produto primário ...	29
4	METODOLOGIA	33
5	RESULTADOS.....	36
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
	REFERÊNCIAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

O licor de maceração do milho é um subproduto da moagem do milho, resultante de um processo que envolve a maceração do milho em água sob condições controladas de temperatura, pH e tempo, o que é muito semelhante a um processo de fermentação, exceto que neste caso a atividade biológica primária é realizada por enzimas (GOVENDER,2008). Dentre as diversas matérias primas utilizadas nas indústrias, o licor se destaca pelo seu custo benefício. Possui um custo relativamente baixo, se comparado ao extrato de levedura, peptona, dentre outros, além de ser um suplemento de fonte de carbono, nitrogênio, aminoácidos, vitaminas, ácidos orgânicos, minerais, dentre outros micronutrientes (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição do licor de maceração do milho

Propriedades gerais	Valores	Análises	Valores
Proteínas	20.5%	Umidade	47,50%
Carboidratos	13-22%	Fibras	1%
Lipídios	1%	Cinzas	8.8%
Massa seca	52.5%	pH	4
Brix	54.5		
Aminoácidos	Valores	Aminoácidos	Valores
Arginina	3.3%	Glicina	5.1%
Isoleucina	3.6%	Metionina	1.9%
Treonina	4%	Leucina	11.3%
Triptofano	0.2%	Lisina	2.5%
Tirosina	5.8%	Histidina	2.8%
Cisteína	1.9%	Valina	3.4%
Fenilalanina	4.4%		
Minerais	Valores	Minerais	Valores
Cálcio	1%	Potássio	4.5%
Magnésio	1.5%	Sódio	0.2%
Fósforo	3.3%	Cloro	0.18%
Enxofre	0.58%	Ferro	0.10%
Vitaminas	Valores	Vitaminas	Valores
Tiamina	1 mg/kg	Ácido pantotênico	8 mg/kg
Riboflavina	5 mg/kg	Piridoxina	2 mg/kg
Niacina	30 mg/kg		

Fonte: Chiani et al. (2010).

Durante a fermentação, bactérias aeróbicas, por exemplo, necessitam de uma gama de nutrientes para que sua conversão de substrato em produto seja efetiva, neste caso a suplementação com meios complexos como o licor de maceração do milho faz-se necessária. Segundo Hofer (2018), a adição do licor em um processo de produção de antibióticos por *Penicillium chrysogenum* na década de 1940, resultou em um aumento na produtividade de cerca de 20%. Outro estudo realizado por Liggett (1948), testou o licor de maceração de milho para cultivo de diferentes microrganismos (Quadro 1), os quais tiveram um bom desempenho:

Quadro 1 - Microrganismos aptos para crescimento com licor de maceração de milho

Bactérias	Leveduras e fungos	Bolores
<i>Acetobacter suboxydans</i>	<i>Candida guilliermondi</i>	<i>Aspergillus flavus</i>
<i>Bacillus macerans</i>	<i>Candida lipolytica</i>	<i>Aspergillus niger</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Endomycopsis fibuliger</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>
<i>Lactobacillus arabinosus</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Eremothecium ashbyii</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Schizosaccharomyces octosporus</i>	<i>Mucor boulard</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Torulopsis utilis</i>	<i>Neurospora crassa</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Zygosaccharomyces japonicus</i>	<i>Oospora lactis</i>
<i>Lactobacillus fermenti</i>	<i>Zygosaccharomyces mellis</i>	<i>Penicillium notatum</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>Zygosaccharomyces nussbaumeri</i>	<i>Penicillium chrysogenum</i>
<i>Micrococcus pyogenes var. aureus</i>	<i>Zygosaccharomyces richeri</i>	<i>Phycomyces</i>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		<i>Rhizopus japonicus</i>
<i>Streptococcus faecalis</i>		
<i>Streptococcus lactis</i>		
<i>Streptomyces cellulosae</i>		
<i>Streptomyces coelicolor</i>		
<i>Streptomyces diastaticus</i>		
<i>Streptomyces flavovirens</i>		
<i>Streptomyces griseus</i>		
<i>Streptomyces microflavus</i>		
<i>Streptomyces olivaceus</i>		

Fonte: Corn steep liquor in microbiology (1948).

Apesar de ser uma matéria-prima complexa e que na maior parte das vezes, causa bons resultados sendo usada como suplementação em fermentações, o licor de maceração do milho pode causar uma variabilidade de processo. Cada lote apresenta uma concentração diferente de sólidos secos, pH, e uma variação de todos os compostos presentes nele, como minerais, aminoácidos e vitaminas. Essa variação se dá devido a diversos fatores que não são controláveis durante a fermentação, como a origem do milho, condições de cultivo, tempo de colheita, clima, ambiente e o nível

de maceração. Sendo assim, o estudo e a caracterização da matéria-prima se fazem necessários, com o objetivo de entender melhor a variabilidade causada durante a fermentação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Caracterizar de maneira quantitativa pelo método ICP-OES (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry) os minerais presentes no licor de maceração de milho.

2.2 Objetivos específicos

1. Descrever, a partir de estudo literário, a importância dos principais minerais em processos microbiológicos
2. Realizar a caracterização dos minerais presentes no licor de maceração de milho em ICP-OES
3. Descrever a importância e os benefícios alcançados ao utilizar o licor de maceração de milho como fonte de matéria prima, de acordo com a caracterização realizada.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Minerais

Há algum tempo o licor do milho é utilizado como nutriente para crescimento de microrganismos. Dentre todos os compostos presentes neste substrato, onde grande parte tem papel essencial na fermentação, para este trabalho optou-se pelo estudo dos minerais em maior concentração. Estes microelementos desempenham um papel importante no metabolismo celular, principalmente devido à sua necessidade como co-fatores para um grande número de enzimas (GADD, 1992; BERG, 2002). Há uma gama enorme de minerais presentes no licor de maceração de milho, e dentre eles há diversas concentrações e formas de disponibilidade diferentes. Para isso deve-se saber quais são as necessidades estruturais das células, que variam de acordo com cada processo fermentativo, e qual o produto que deseja ser obtido.

Como um exemplo, pode-se citar elementos como enxofre e fósforo, os quais fazem parte integral de proteínas, carboidratos, lipídeos e outros componentes celulares. Em sua maioria, os sais minerais são requeridos para a manutenção do equilíbrio da membrana celular, regular a pressão osmótica, constituir sistemas enzimáticos e, finalmente, como matéria-prima na síntese de constituintes protoplásmáticos (LOPES, 1989).

Os minerais também são chamados de microelementos, ou também de elementos traços. Geralmente estão presentes em quantidades pequenas no organismo, expressos em mg/kg ou ppm (partes por milhão) e mesmo assim desempenham funções de extrema importância. Sendo assim, a caracterização e quantificação dos mesmos se torna essencial para dados fermentativos.

3.1.1 Alumínio

O alumínio é o metal mais abundante do planeta e o terceiro elemento em teor na crosta terrestre, principalmente nas formas insolúveis e atóxicas de aluminossilicatos ou óxidos. À medida que os solos se tornam mais ácidos, formas fitotóxicas de alumínio são disponibilizadas, nomeadamente o íon Al^{3+} , na forma hexahidratada de $\text{Al}(\text{H}_2\text{O})_6^{3+}$ (KOCHIAN, 1995). Essa citotoxicidade do alumínio já foi demonstrada em diversos sistemas biológicos, sendo considerada um importante fator

limitante da produtividade de muitas culturas, especialmente nos trópicos. Além do efeito tóxico em plantas, há estudos que apontam que efeitos relacionados podem ser observados também em bactérias, fungos, e também em leveduras utilizadas na fermentação alcoólica. (ZEL *et al.*, 1993 ; NOLASCO, 2017).

Segundo Amaral e Aranha (2002), durante a fermentação alcoólica, o mosto e o meio fermentativo podem ser contaminados pelo alumínio através da cana-de-açúcar cultivada em solos ácidos com grande disponibilidade de alumínio e da utilização de água tratada com alúmen de potássio ou sulfato de alumínio, um tratamento muito comum em meio industrial. Um estudo realizado por Nolasco (2017) diz que o efeito inibidor do alumínio sobre as leveduras, reduz a produção de etanol significativamente conforme há um aumento da quantidade de alumínio no material. Isso pode ser explicado pela liberação dos íons Al^{3+} , cátions que possuem caráter tóxico para as leveduras entre outros organismos (FOY e GERLOFF, 1972; DATE e HOLLIDAY, 1979; GUIDA *et al.*, 1991; ZEL *et al.*, 1993).

3.1.2 Boro

O boro é um micronutriente que difere dos demais pela não identificação de sua participação na composição de qualquer composto ou enzima específica, sendo sua especialidade determinada pelo critério indireto (DECHEN *et al.*, 1991).

Segundo Bologna (2003), apesar do boro não fazer parte de nenhum composto específico, são várias as funções que este elemento desempenha nas plantas. Dentre outras funções, seu papel no crescimento radicular é, sem dúvida, um dos mais importantes. Grassi Filho (1991) estudou os efeitos de diferentes doses de boro no crescimento radicular do limoeiro Cravo, logo ele observou que, uma maior dose de boro proporcionou um maior comprimento nas raízes. Outro trabalho realizado por Lenoble *et al.* (1993), diz que os sintomas de toxidez por alumínio e deficiência de boro causam uma inibição no crescimento radicular, confirmando assim que o boro é de grande importância para o desenvolvimento do mesmo. Após essas afirmações, vários experimentos foram realizados a fim de determinar se níveis superiores ou adequados de boro poderiam minimizar os sintomas de toxicidade causados pelo alumínio (BOLOGNA, 2003).

Além dos estudos relacionados com o alumínio, a fim de minimizar os sintomas de toxidez, pode-se encontrar ainda relações do boro na translocação de

açúcares, amidos e carboidratos. O boro tem a capacidade de ligar-se a esses compostos, formando complexos que atravessam mais facilmente as membranas celulares do que as moléculas originais, as quais representam um alto peso molecular (SHELP, 1993).

Outra importante função do boro está relacionada ao metabolismo ou incorporação do cálcio na parede celular (YAMAUCHI *et al.*, 1986), ou seja, este elemento atua na biossíntese da parede celular auxiliando o cálcio na decomposição e formação de pectatos envolvidos na construção dessas estruturas. A deficiência em boro altera a estrutura e a organização celular das membranas, causando uma desestruturação (CAKMAK *et al.* 1995). Já segundo Graham & Webb (1991), outra consequência da deficiência do boro, também relacionada às plantas, é o aumento na concentração de ácido endol acético (IAA), pois a atividade da IAA oxidase é inibida, resultando em acúmulo de compostos fenólicos nas regiões de crescimento das plantas, mais notadamente raízes e gemas terminais. Em outra pesquisa realizada para o mirtilo, o boro aumentou a biomassa da cultura em relação às mudas e foi favorável à produção de compostos fenólicos, como ácido clorogênico, ácido ferúlico, miricetina e quercetina (MERIÑO-GERGICHEVICH *et al.*, 2017; MERIÑO-GERGICHEVICH *et al.*, 2019).

3.1.3 Cálcio

O cálcio é um mineral de suma importância para diversos processos fermentativos. Os íons Ca^{2+} são centrais para um sistema mensageiro intracelular complexo que está mediando uma ampla gama de processos biológicos: contração muscular, secreção, glicólise e gliconeogênese, íons transporte, divisão celular e crescimento (BERTINI *et al.*, 1994). Além disso, há evidências de que o cálcio está envolvido em uma série de processos bacterianos, como manutenção da estrutura celular, motilidade, expressão gênica e processos de diferenciação celular, como esporulação, formação de heterocistos e desenvolvimento do corpo de frutificação (SMITH, 1995 ; NORRIS *et al.*, 1996). Uma informação relevante em relação ao cálcio, segundo Amorim *et al.* (2009), é que níveis elevados de cálcio presentes em melaço de cana podem causar estresse osmótico, o que prejudica o desempenho da levedura.

Já segundo Letti (2014), o pH de um meio de cultivo durante a fermentação é

um fator decisivo para o crescimento microbiano e conseqüentemente para a produção de L-Lisina, sendo este o aminoácido a ser estudado no caso. Segundo a pesquisa realizada, o carbonato de cálcio foi o agente mais eficiente para tamponar o meio, levando em consideração produção em escala de bancada.

3.1.4 Cromo

O cromo é um dos metais pesados mais tóxicos e um dos seus principais problemas é seu descarregamento no meio ambiente pelo despejo de efluentes de diversos setores industriais, como o metalúrgico, siderúrgico, têxtil, curtumes, dentre outros. Esses efluentes contêm íons Cr(VI) e Cr(III) em concentrações que variam de décimos a centenas de miligramas por litro (BARAL e ENGELKEN, 2002). Pode ser encontrado em nove estados de oxidação, variando de -2 a +6, mas somente os estados trivalente e hexavalente são suficientemente estáveis para ocorrerem no ambiente. A sua toxicidade vai depender do estado de oxidação em que é encontrado (DERMOU *et al.*, 2005). O cromo não é biodegradável e tende a acumular em organismos vivos causando doenças e distúrbios graves (BAILEY *et al.*, 1999; BARRERA *et al.*, 2006; MOHAN *et al.*, 2006). Sendo assim, os estudos atuais em torno deste tipo de mineral abrangem sua remoção e tratamento. Segundo Wang e Shen (1997), uma tecnologia bastante utilizada para o tratamento de metais pesados, como o cromo, é a precipitação química.

3.1.5 Cobre

O cobre participa de diversos processos no organismo, tais como a metabolização do ferro por enzimas, que são cobre-dependentes. A formação de elastina e do colágeno, que são proteínas presentes em várias partes do corpo como, por exemplo, nos vasos sanguíneos. E também na produção de melanina, responsável pela pigmentação da pele, pelos e lã (GUERRA, 2008).

O cobre está presente em várias enzimas: como parte da citocromo-oxidase, enzima oxidase terminal na cadeia respiratória, que catalisa a redução de O₂ para água, passo essencial na respiração celular. Também a lisil oxidase que catalisa a formação do colágeno e elastina. Está presente também no transporte de ferro necessário para a síntese de hemoglobina, e por fim a superóxido dismutase que protege as células dos efeitos tóxicos no metabolismo do oxigênio.

Segundo Guerra (2008), como o cobre esta envolvido no mecanismo de oxidação, sua deficiência leva a transtornos no metabolismo oxidativo. Complementando, Jones (1990), diz que os íons cobre são muito interessantes porque têm um efeito positivo na atividade respiratória e na taxa de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*.

Lopes (2002), em uma pesquisa relacionada ao efeito do sulfato de cobre no controle da população de fungos, diz que a ideia de se usar o cobre e seus derivados no controle de microrganismos, surgiu porque é um produto largamente empregado para controle de microrganismos na agricultura, para inibir crescimento de algas e fungos em piscinas e em reservatórios de água. Alguns pesquisadores observaram que em monumentos onde havia pedaços de latão e bronze incrustados na parede, estes sofriam lixiviação e escorriam sobre a parede. Por onde o cobre passava não havia o desenvolvimento de microrganismos embora ao redor estivesse infestado.

Sendo assim, complementando o estudo anterior, observa-se que o cobre é muito usado por profissionais da área da preservação por ser uma substância extremamente tóxica para as células dos microrganismos, especialmente devido ao sinergismo com diferentes substâncias orgânicas (RESENDE, 1997). Trabalhando com uma concentração de sulfato de cobre 0,01M, pesquisadores conseguiram reduzir a população de algas em 75%. Para as áreas com forte incidência de fungos, usaram o sulfato de cobre 0,1M e a população destes microrganismos foi reduzida em 95% (BECKER *et al.*, 1994). De acordo com Lorenzi (1981), o cobre e seus compostos entre eles o fosfato de cupritetramina $(\text{NH}_3)_4\text{CuSO}_4$, têm apresentado ótimos resultados no controle de microrganismos, inclusive algas.

3.1.6 Ferro

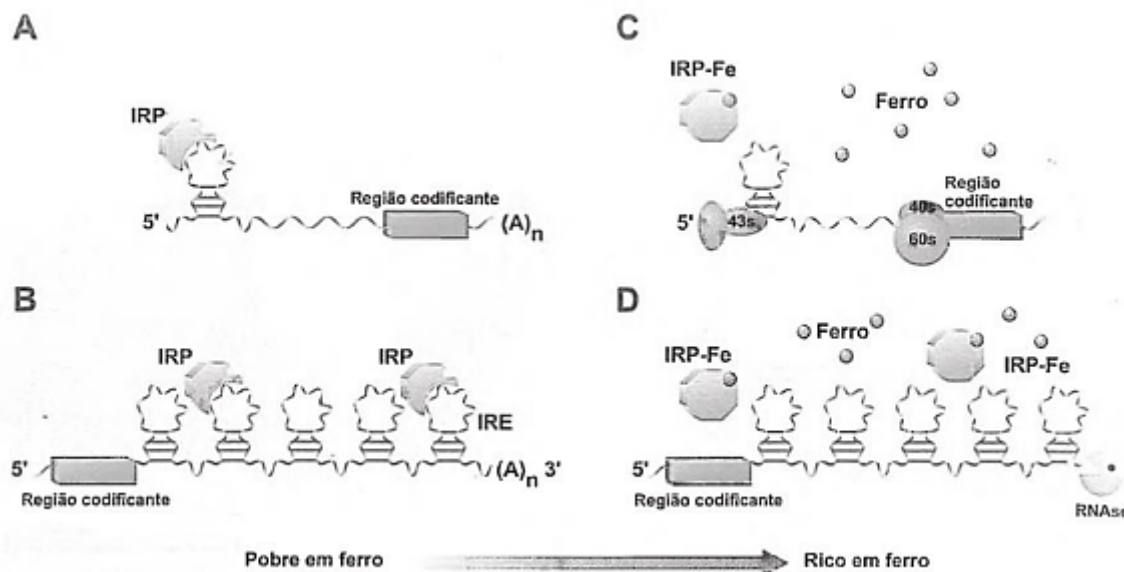
Se tratando de processos biológicos, o ferro é essencial para o transporte de oxigênio, para a síntese de DNA e também para o metabolismo energético. É um cofator importante para enzimas da cadeia respiratória mitocondrial e na fixação do nitrogênio (GROTTO, 2008). Hentze(2004) diz que os níveis de ferro na célula devem ser devidamente equilibrados, pois a elevada concentração de ferro leva a danos de radicais livres pela reação de Fenton. A reação de Fenton ocorre quando o excesso de ferro reage com oxigênio para gerar radicais hidroxila, produzindo assim espécies com alto poder oxidante. Explicando melhor essa reação, o ferro também pode variar

seu estado redox e pode ser rapidamente oxidado a partir de Fe^{2+} a Fe^{3+} (ferro ferroso a férrico) na presença de oxigênio. Essa reação gera o ânion superóxido, que através de uma série de redox reações levam à geração de radicais hidroxila tóxicos (DE SILVA *et al.*, 1996). Além disso, os sais férricos são intrinsecamente instáveis em meio aquoso, podendo ocasionar na formação hidrolítica irreversível de hidróxi- Fe^{3+} , estando na forma insolúvel (WELCH, 1992). A insolubilidade dos íons férricos cria problemas consideráveis para todos os organismos.

Sabe-se que o metabolismo celular do ferro envolve sua absorção, regulação e utilização para processos celulares. Para alcançar níveis apropriados de ferro na célula, assim evitando a sobrecarga, e auxiliando no transporte e armazenamento, proteínas regulatórias foram estudadas (SARGENT *et al.*, 2005; ANDREWS, 2018).

O IRP/IRE (*Iron regulatory protein/Iron responsive element*) consiste num complexo de proteínas regulatórias celulares, que ajustam o estoque intracelular de ferro, bem como sua utilização por parte do organismo e metabolismo do mesmo (MUCKENTHALER, 2008). O IRP pode ser subdividido em dois tipos: o IRP1 e o IRP2, sendo que ambos operam em conjunto visando codificar genes responsáveis por otimizar e qualificar a utilização de ferro pelas células, visando não gerar excesso e nem falta desse nutriente, de modo que o metabolismo das mesmas possa se dar de maneira efetiva a partir da utilização desse íon (MUCKENTHALER, 2008). O IRP1 constitui-se como a forma mais ativa do que o IRP2, no entanto, ambas as proteínas interagem com o IRE, que é exposta na superfície da transferrina, ferritina, e outras proteínas, e atua como um sinalizador da chegada das mesmas, de modo que assim o IRP pode saber que existe ferro chegando ou saindo da célula. Ela atua como um marcador biológico da presença do ferro (ZAGO, 2013). Como resultado, a interação entre essas proteínas pode aumentar ou não o sequestro e a utilização de ferro pela célula.

Figura 1 - Sistema regulatório IRP-IRE



Fonte: ZAGO *et al.* (2013, p.142)

Os genes envolvidos no metabolismo de ferro podem ser divididos de acordo com sua função no processo global. Genes que são sintetizados dentro da célula e excretados no meio para capturar ferro e trazê-lo de volta em uma forma não disponível aos outros organismos são chamados sideróforos. Durante o processo de assimilação, necessitam-se receptores que reconhecem especificamente estas moléculas acopladas ao ferro para iniciar o processo de internalização, visando à extração de ferro do sideróforo para participação no metabolismo celular. Uma vez dentro da célula, algumas proteínas utilizam diretamente o ferro em reações químicas e outras monitoram os níveis do ferro dentro da célula (FORMIGHIERI, 2002).

3.1.7 Potássio

Uma das mais importantes funções do potássio no organismo é seu papel na geração e manutenção do potencial iônico da membrana celular (CONRADO, 2010). Ainda segundo Conrado (2010), algumas enzimas celulares requerem potássio para que funcionem adequadamente, como a piruvato quinase, que transfere o grupo fosfato do fosfoenolpiruvado para o ATP, na fosforilação durante a glicólise. Como soluto, o potássio intracelular é crucial para a manutenção do volume celular normal. A concentração de potássio intracelular é crucial para a manutenção do volume celular normal, sendo este necessário para o funcionamento de enzimas responsáveis pela

síntese de proteínas, ácidos nucleicos e glicogênio.

3.1.8 Magnésio

O magnésio (Mg) é o segundo cátion intracelular mais abundante. Ele é cofator de aproximadamente 300 reações enzimáticas, principalmente das que utilizam ligação fosfato de alta energia. Dessa forma, o Mg participa de inúmeros processos metabólicos, inclusive daqueles ligados ao metabolismo de carboidratos envolvidos na regulação da secreção e ação da insulina (ELIN, 1994). Segundo Stehlik-Thomas *et al.* (2004), o magnésio atua também na manutenção da homeostase celular. No entanto, quantidades excessivas deste componente pode ser tóxico e pode causar danos nas funções que estão associados.

Souza *et al.* (2014) nos diz que o (Mg^{2+}) é o mais abundante cátion divalente intracelular e representa cerca de 0,3% do peso seco da célula de levedura. Complementando Elin (1994), este elemento atua como um cofator para diversas enzimas envolvidas em diferentes reações metabólicas, tais como o ADN e a síntese de ATP (SOUZA *et al.*, 2014). Além disso desempenha funções múltiplas na fisiologia de células de levedura em níveis citológicos, bioquímicos e biofísicos, e é muito importante em processos de fermentação industrial, nos quais é necessário para a ativação de várias enzimas glicolíticas e na proteção dos estresses ambientais durante a fermentação, tais como aquelas causadas pelo etanol, temperaturas elevadas ou alta pressão osmótica (NOLASCO, 2017). Ainda segundo Nolasco (2017), a utilização de magnésio aumentou a produtividade das leveduras, elevando a concentração de etanol no substrato, podendo elevar a produtividade de 4,87 para 6,32 g/L. De acordo com trabalho realizado com o objetivo de avaliar a influência do magnésio em processos fermentativos de resíduos hidrolisados da cultura da bananeira, a adição de magnésio no mosto fermentativo pode ser uma prática que aumente a produtividade do bioetanol produzido a partir deste resíduo.

3.1.9 Manganês

O manganês é um oligoelemento essencial para todos os organismos (Keen, *et al.* 2000). Serve como cofator para as reações catalisadas por metaloproteínas incluindo DNA e RNA polimerases, peptidases, carboxilases, superóxido dismutase, açúcar transferases e o complexo de oxidação da água no fotossistema II (Reddi *et*

al.,2009). A disponibilidade de manganês para a célula é, portanto, essencial. Em um trabalho realizado por Fejes *et al.* (2020), em fungos, a deficiência de manganês demonstrou resultar em alterações na morfologia das hifas e redução da esporulação (Shu *et al.* 1947). Em *Aspergillus niger*, a deficiência de manganês resulta em elevada produção e excreção de ácido cítrico (Shu *et al.* 1947;1948), que hoje é o processo industrial exclusivo para a produção desse metabólito. Para alcançar altos rendimentos, a concentração de manganês no meio deve ser mantida em ou abaixo de $5 \mu\text{g L}^{-1}$, o que excede a quantidade ligada como contaminante à fonte de carbono necessária para esta fermentação (Karaffa *et al.* 2003). Segundo Jones (1990), os íons manganês são muito interessantes porque têm um efeito positivo na atividade respiratória e na taxa de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*.

3.1.10 Molibdênio

Segundo pesquisa realizada o molibdênio é bastante utilizado na agricultura como fertilizante, participando principalmente da síntese e ativação das enzimas nitrogenase e redutase, ligadas diretamente ao metabolismo do nitrogênio. A importância do Mo no processo de fixação biológica de nitrogênio (FBN) foi, primeiramente, descrita por Bortels (1930), que demonstrou que *Azotobacter vinelandii*, quando inoculado em meio de cultura sem N combinado, necessitava de Mo para crescer, o que não ocorria se a fonte de N do meio de cultura fosse o amônio. Verifica-se, em estudos científicos, que as principais fontes de Mo são o molibdato de sódio, molibdato de amônio, ácido molíbdico e trióxido de Mo (ALBINO *et al.*, 2000).

3.1.11 Sódio

O acetato de sódio é solúvel e de fácil assimilação pelas bactérias heterotróficas na presença de oxigênio (SANTOS *et al.*, 2020). Segundo trabalho realizado a fim de avaliar o efeito do sódio em *Clostridium acetobutylicum* para produção de biomassa, observou-se que, a partir de um teor inicial de acetato de sódio de 30 mM no meio de crescimento de clostrídios, uma inibição significativa do crescimento celular observada a partir de 10g/L. Quando a concentração de NaCl atinge 25g/L não há crescimento celular. Sendo assim, o sódio afeta a biomassa e o metabolismo na produção de acetona-butanol-etanol (ZHAO *et al.*, 2016).

3.1.12 Fósforo

O fósforo é um dos principais constituintes da célula, perfazendo cerca de 1,5 a 2,1% do peso seco da célula. Este elemento ocorre na forma inorgânica como ortofosfato (Pi), pirofosfato (PPi) ou polifosfato (polyPi) e em numerosos organofosfatos, como nucleotídeos, fosfatos de açúcar e fosfolipídios. Os principais componentes das células que contêm fósforo são os polímeros RNA, DNA e polifosfato. Em se tratando da energia necessária durante a fermentação, o fósforo desempenha um papel central no metabolismo energético, uma vez que a energia livre obtida pela oxidação de substratos é usado para gerar ATP a partir de ADP e Pi (EGGELING *et al*, 2005).

3.1.13 Chumbo

Assim como o cobre, o chumbo é considerado um metal pesado, onde os resíduos do mesmo são classificados pelas normas brasileiras como perigosos. O contato humano com o chumbo pode levar a distúrbios de praticamente todas as partes do organismo - sistema nervoso central, sangue e rins culminando com a morte. Em doses menores, acarreta alteração na produção de hemoglobina e em processos bioquímicos cerebrais causando alterações psicológicas e comportamentais. Devido à sua baixa solubilidade, a absorção dá-se principalmente por via oral ou respiratória (FERREIRA *et al.*, 2007). Sendo assim, alternativas de tratamento e biossorção vem sendo estudadas para a remoção deste metal em diversas situações, considerando que a suplementação do mesmo está fora de questão.

3.1.14 Enxofre

O enxofre é essencial para o crescimento microbiano porque é um constituinte da cisteína, metionina, proteínas de ferro-enxofre, coenzima A, ácido lipóico, micotiol, biotina, tiamina e tRNA. Dentre estes citados acima, a cisteína e metionina são os compostos contendo enxofre predominante dentro da célula. Normalmente, apenas os compostos de enxofre oxidados como o sulfato estão disponíveis para a célula, os quais devem ser reduzidos ao nível de sulfeto antes incorporação nos compostos orgânicos de enxofre (redução assimilatória). Alguns organismos usam compostos de enxofre inorgânicos para o metabolismo da energia (EGGELING *et al*, 2005).

Por ser um elemento essencial para o crescimento bacteriano, pode ser assimilado

de uma variedade de fontes. Segundo Ploeg (2001), cisteína é a fonte preferida de enxofre para *Escherichia coli* e muitas outras espécies bacterianas. Sua presença no meio resulta na repressão das enzimas envolvidas no enxofre como uma simulação do sulfato.

3.1.15 Zinco

Em um estudo realizado por Jones (1990), os íons zinco mostraram-se muito interessantes porque têm um efeito positivo na atividade respiratória e na taxa de crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*. Em um outro estudo feito sobre o impacto da suplementação de zinco na melhoria da tolerância ao etanol e rendimento de fermento autofloculante em fermentação contínua, observou-se que a produção de etanol foi aumentada em todas as culturas de adição de zinco, com a melhoria mais significativa quando 0,05 g/L de sulfato de zinco foi empregado (ZHAO *et al.* 2008). Ainda sobre esse estudo verificou-se que a adição de zinco induziu o acúmulo de ergosterol e tra-helose nas células de levedura, o que pode ser responsável pela tolerância melhorada ao etanol.

3.1.16 Outros minerais

Além de todos os elementos já mencionados, também podem estar presentes no licor de maceração do milho: cobalto, lítio, níquel, estrôncio e vanádio. Os efeitos destes elementos nos processos fermentativos ainda não estão completamente elucidados, sendo escassa a literatura sobre o assunto. Ainda sim, tais componentes foram analisados neste trabalho na tentativa de contribuir no estudo do tema.

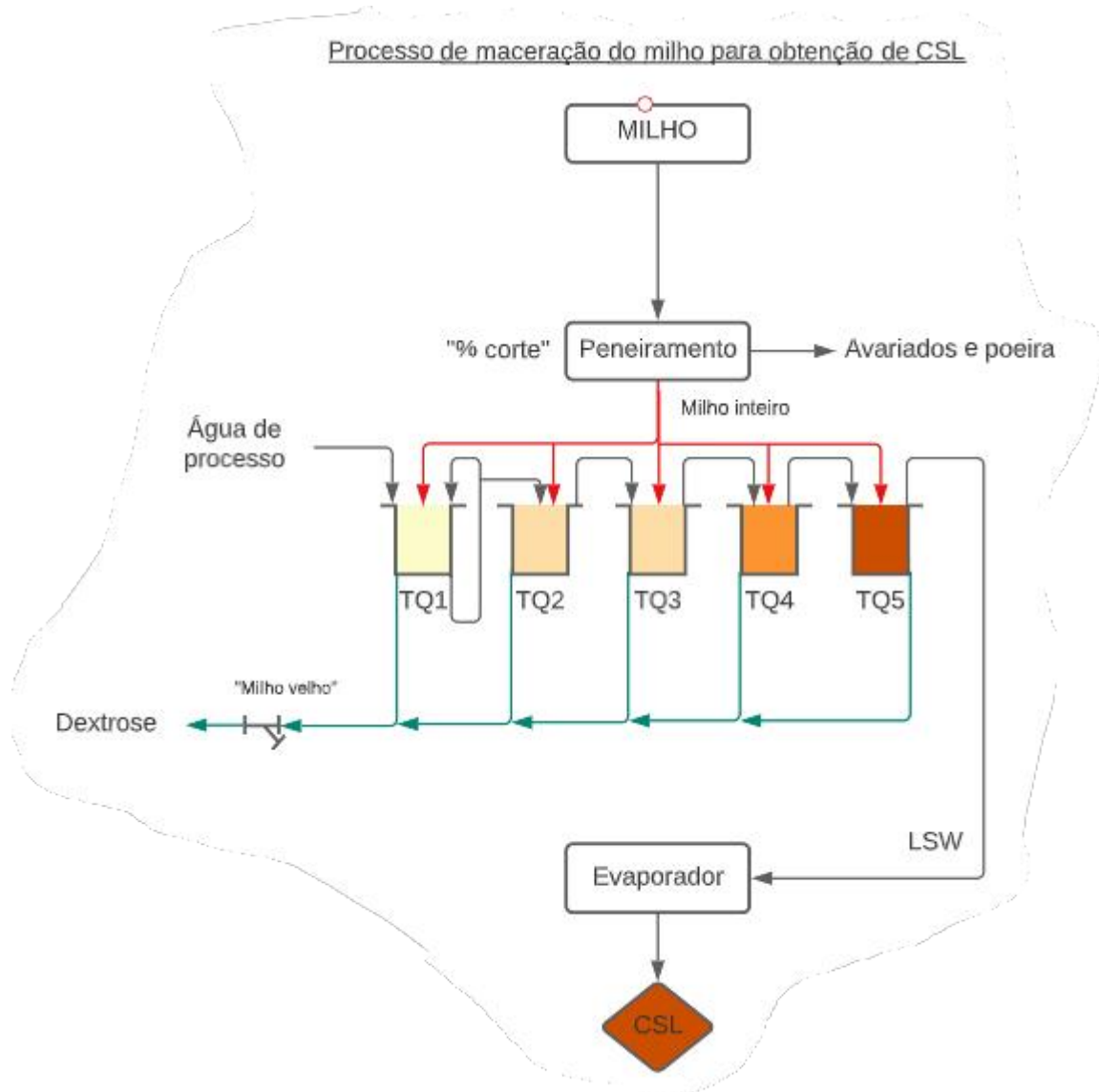
3.2 Licor de maceração de milho

O processo de maceração do milho para obtenção do licor se inicia com a chegada do grão na indústria que irá processá-lo. Para que a carga do milho seja aceita, alguns parâmetros devem ser levados em consideração, como a porcentagem de avariados, que são grãos que sofrem danos mecânicos durante o transporte, perdendo assim propriedades do gérmen, como também a concentração de poeira, assim chamado o milho moído decorrente do atrito do transporte e até mesmo do peso da carga. Outra condição que deve ser considerada é a concentração de micotoxinas presentes, que são substâncias químicas tóxicas, geralmente produzidas por fungos,

e que em grande acúmulo podem causar malefícios à fermentação. A Figura 1 nos mostra o processo em questão, dando destaque à etapa de maceração para obtenção do licor de maceração do milho. Antes de passar pelos evaporadores, a carga de milho passa por uma etapa de peneiramento, que consiste em filtros com determinada % de corte, onde ocorrerá a seleção do material, separando assim os avariados e a poeira, como citados anteriormente.

Após a etapa de peneiramento, o milho inteiro segue para tanques de maceração, dispostos de forma sequencial (Figura 2), a uma temperatura de aproximadamente 48-52°C, mantida através de um trocador de calor, durante 40 a 48 horas. Para que não ocorra a perda da matéria prima e haja uma homogeneidade na mistura, ocorre um processo chamado “bottled up”, onde a água de processo é reutilizada, retornando parcialmente ao tanque. Como os tanques não possuem agitação, esse processo diminui a perda de sólidos da matéria seca do milho. O primeiro tanque fará a lavagem do grão, do milho então amolecido, dissolvendo assim os materiais solúveis presentes através do enfraquecimento e quebra da sua estrutura, formando um caldo rico em amido, proteína, vitaminas e sais minerais. O caldo concentrado vai passando por todos os tanques, os quais reutilizam a água em todas as etapas de maceração, fazendo com que a água mais diluída entre em contato com o milho que está sendo macerado a mais tempo, sendo transferida continuamente para o milho novo (adicionado recentemente) nos tanques sequenciais, com a finalidade de concentrar o licor. Após obter o caldo concentrado, com um teor de sólidos de aproximadamente 50%, o mesmo passará por uma etapa de evaporação, obtendo assim o produto final (LIGGETT *et al.* 1948).

Figura 2 - Processo de maceração úmida do milho

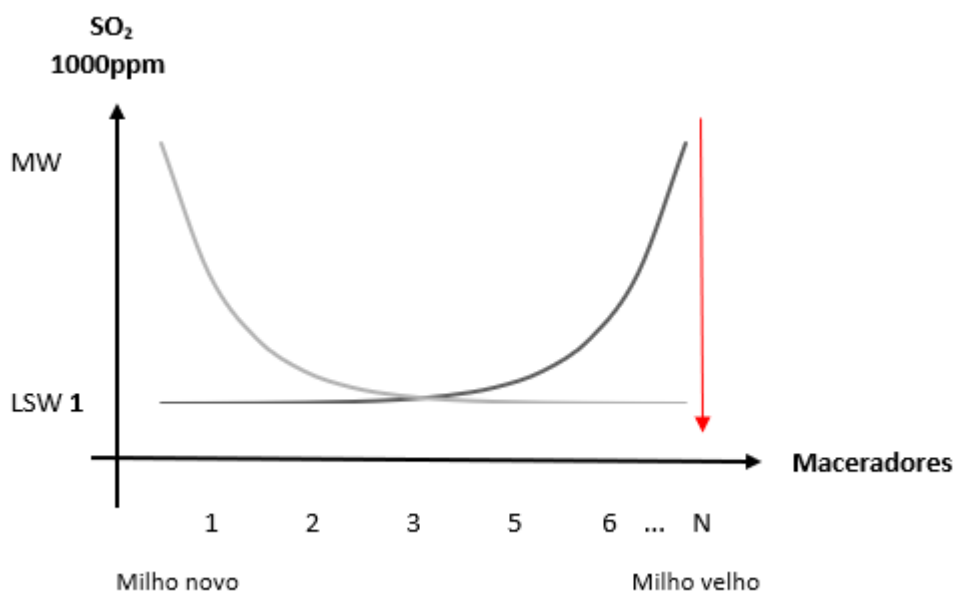


Fonte: Adaptado de Steeping maize in the presence of multiple enzymes. ii, continuous conutercurrent steeping (STEINKE, 1991).

Durante a adição da água de processo nos tanques, há a adição de SO_2 no meio para evitar a deterioração do milho e também auxiliar na separação de seus componentes. A concentração inicial é de aproximadamente 1000ppm, e no decorrer do processo a maior parte da mesma é absorvida pelo milho e volatilizada com o processo, como mostra a Figura 3. A medida que a água de processo vai passando pelos maceradores e processando o milho, o SO_2 vai diminuindo. Assim como a medida que a LSW (Light Steep Water) aumenta, o SO_2 também aumenta, sendo absorvido pelo meio. As proteínas do milho são relativamente insolúveis em água, porém elas incham e se dissolvem até certo ponto em água acidificada. Uma certa

quantidade de acidez é, portanto, essencial para a separação eficiente do amido do glúten, e o ácido láctico complementa a ação do SO_2 (JACKSON *et al.* 1995).

Figura 3 – Gráfico de absorção de SO_2 relacionado a produção de Light Steep Water



Fonte: Adaptado de JACKSON *et al.* (1995).

A concentração de sólidos secos presente no licor depende do tempo de maceração e da temperatura atingida durante o processo, sendo que uma maceração incompleta ocasiona em uma quantidade maior de material não solubilizado, e a maceração excessiva tende a deixar uma quantidade maior de polissacarídeos na fase líquida. O licor obtido ao final desse processo possui uma enorme biodisponibilidade de substâncias necessárias para o processo de fermentação. Com pH variando entre 3,8 e 4,2, antes de passar por um processo de esterilização, o licor contém bilhões de microrganismos viáveis, levando-se em consideração que a matéria-prima permanece em constante multiplicação, devido às condições favoráveis de crescimento.

Em um estudo realizado por Rahman *et al.* (2012), com o objetivo de avaliar o potencial de produção de isolados de *Penicillium chrysogenum* utilizando licor de maceração do milho, avaliou que a adição do licor resultou em uma produção de 1,20g/L de penicilina por *P. Chrysogenum*. Também neste estudo, o meio de fermentação onde foi substituído o bagaço de cana de açúcar por licor de maceração do milho, resultou em um maior rendimento de penicilina (1,92g/L). Calam *et al.*

(1948), mencionou que a adição adequada de sais minerais para produção de penicilina deve incluir magnésio, potássio, ferro, zinco, cobre, manganês, cobalto, fósforo e flúor. Ele observou também que a composição do licor de maceração do milho possui grande eficácia como suplemento do meio devido a presença de todas essas substâncias em concentrações consideráveis.

Em outro estudo realizado por Lawford *et al.* (1997) sobre a utilização de licor de maceração de milho como adjunto nutricional econômico em fermentações de etanol de *Zymomonas* de alto desempenho, foi constatado que o licor pode ser usado como um complemento nutricional de baixo custo para fermentações de *Zymomonas*. Porém neste estudo o licor utilizado foi clarificado, descontando os sólidos insolúveis presentes. Os resultados obtidos informaram que a remoção destes sólidos não prejudicou significativamente sua eficácia nutricional, onde o licor clarificado foi 1,33 vezes mais eficaz (em termos de rendimento de massa e tempo de fermentação), do que o licor de maceração do milho com os sólidos totais.

A produção de bioetanol é uma crescente no mercado nos tempos atuais. Pensando nisso, Taiwo *et al.* (2018) iniciou uma pesquisa com foco em aumentar sua viabilidade econômica. Para isso realizou um estudo de desenvolvimento de um meio de fermentação de baixo custo, e que atendesse às demandas do microrganismo *Saccharomyces cerevisiae* para produção de bioetanol. Neste caso, o licor de maceração de milho foi utilizado como substituto para o extrato de levedura, e observou-se com o licor concentrações médias máximas de etanol de 41,92 e 45,16g/L, representando 82 e 88% do rendimento teórico, após 36 horas de fermentação. Esse experimento foi realizado em frasco agitado, porém pode-se constatar que o licor de maceração de milho é um nutriente potencial barato e de custo baixo para produção comercial de etanol.

Hamano (2006), realizou um trabalho relacionado a produção de pigmentos vermelhos por *Monascus ruber* em meio de cultura contendo 10 g/L de glicose, 5 g/L de licor de maceração de milho e 7,6 g/L de glutamato monossódico licor de maceração do milho, e observou que o meio de cultivo contendo esse meio complexo resultou em maiores valores de absorvância do pigmento vermelho extracelular (20,7 U) e produtividade (0,35 U/h). Além disso, neste meio acumulou-se menos pigmentos vermelhos intracelulares, se comparado ao meio semissintético utilizado.

Atualmente, fontes de carbono e nitrogênio obtidas a partir de subprodutos agroindustriais tem se mostrado adequadas para produção de diversos produtos.

Segundo Cunha *et al.* (2018), em estudo realizado com a finalidade de testar meios com batata doce, licor de maceração de milho e carbonato de cálcio para produção de ácido láctico por *Lactobacillus rhamnosus*, observou que o licor de milho mostrou-se como um excelente substituto para o extrato de levedura, conseguindo um melhor desempenho.

De acordo com Eggeling *et al.* (2005), pelo menos 70% da L-lisina produzida pelas indústrias é baseada em fontes de carbono como dextrose e sacarose. No entanto, uma vez que a maioria utiliza cepas de produção, as mesmas precisam de aminoácidos, peptonas e matérias-primas complexas como o licor de maceração de milho, hidrolisado de farelo de soja e outros.

Sharma *et al.* (2012), realizou um trabalho onde avaliou 5 diferentes resíduos agrícolas, dentre eles o licor de maceração de milho. Juntamente foi adicionado glicose a 15% (p/v) como fonte de carbono para biossíntese de pululano usando *Aureobasidium pullulans*, e entre os resíduos testados, o licor de maceração de milho foi considerado o melhor e suportou a produção de 77,92g/L de pululano em condições não otimizadas. Uma análise econômica do processo sugeriu que o uso do licor de maceração de milho como nutriente pode resultar em uma redução de 3 vezes no custo de matérias-primas para a produção de pululano em comparação com o processo em que fontes convencionais de nitrogênio foram usadas.

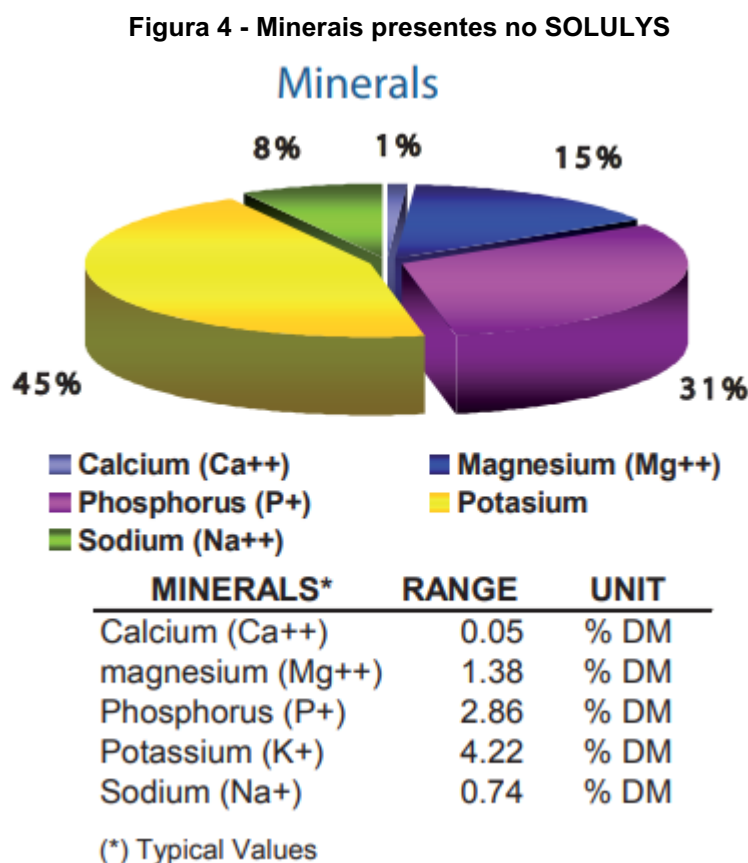
3.3 Produção de licor de maceração de milho como produto primário

Atualmente a empresa francesa Roquette Frères produz um licor de maceração milho estável. Através da caracterização completa do licor pode-se saber quais as principais substâncias presentes nesse meio complexo e suas concentrações, e com isso, através de testes produzir um meio que possa substituir e proporcionar os mesmos nutrientes demandados em processos microbiológicos. A ideia dessa indústria é focar no processamento do milho para produção do licor advindo da maceração (CSL). Geralmente as indústrias que processam o milho focam em purificar o amido e dar prioridade a produtos primários como dextrose, por exemplo. Nestes casos, o licor de maceração de milho é um resíduo do processo, sofrendo diversas variações durante o processamento, sendo que o controle de parâmetros é destinado para garantir a melhor qualidade dos produtos primários.

A Roquette foca na produção de licor de maceração do milho, direcionando o

controle dos parâmetros de produção para minimizar o máximo a variação dos nutrientes presentes no produto final. Com base nisso, tem-se uma formulação constante, atendendo testes de pequena escala e produções de grande escala. A indústria possui um processo definido e patentado, oferecendo o “Liquid SOLULYS® 048” e “Powder SOLULYS® 095”. Estes produtos oferecem alto teor de proteína, excelente fonte de nitrogênio, baixo teor de açúcares residuais, composição estável e componentes chave como: vitaminas, minerais e oligoelementos (ROQUETTE, 2022).

De acordo com informações fornecidas pela empresa, se tratando dos minerais, que são o foco deste trabalho, o produto oferecido contém concentrações ideais de minerais importantes, como mostra na Figura 4:

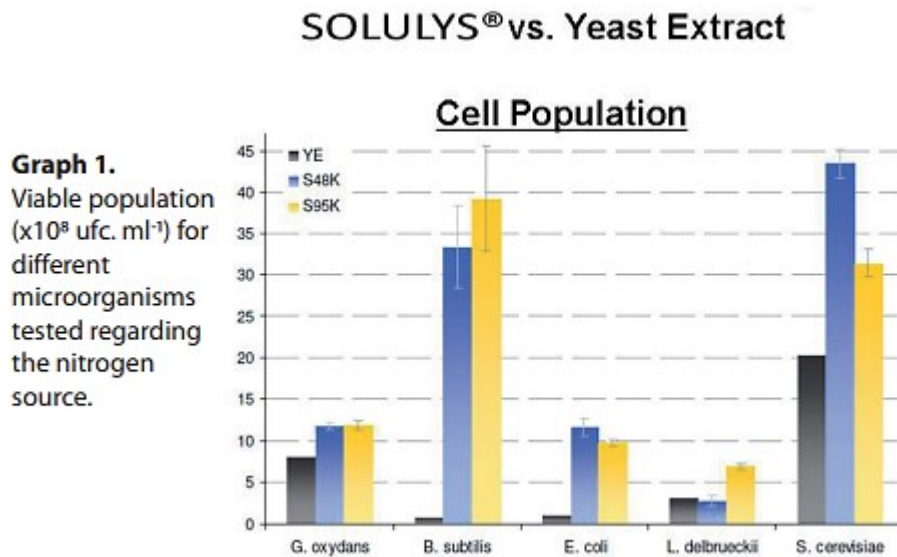


Fonte: www.roquette.com.

Testes foram realizados para fornecer dados de população e viabilidade celular, utilizando SOLULYS líquido, em pó e extrato de levedura, e comparando seu desempenho para diferentes microrganismos. Como mostram as Figuras 5 e 6, o produto oferecido fornece significativa vantagem, que pode ser associada à sua fonte

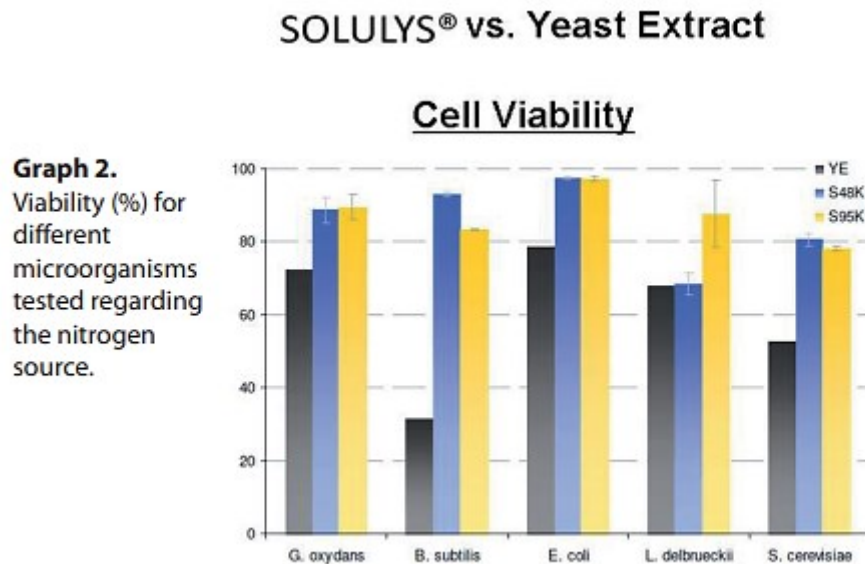
de nutrientes e à variabilidade minimizada devido ao processo produtivo de licor de maceração de milho.

Figura 5 – Concentração de células utilizando diferentes substratos



Fonte: www.roquette.com.

Figura 6 – Viabilidade celular utilizando diferentes substratos



Fonte: www.roquette.com.

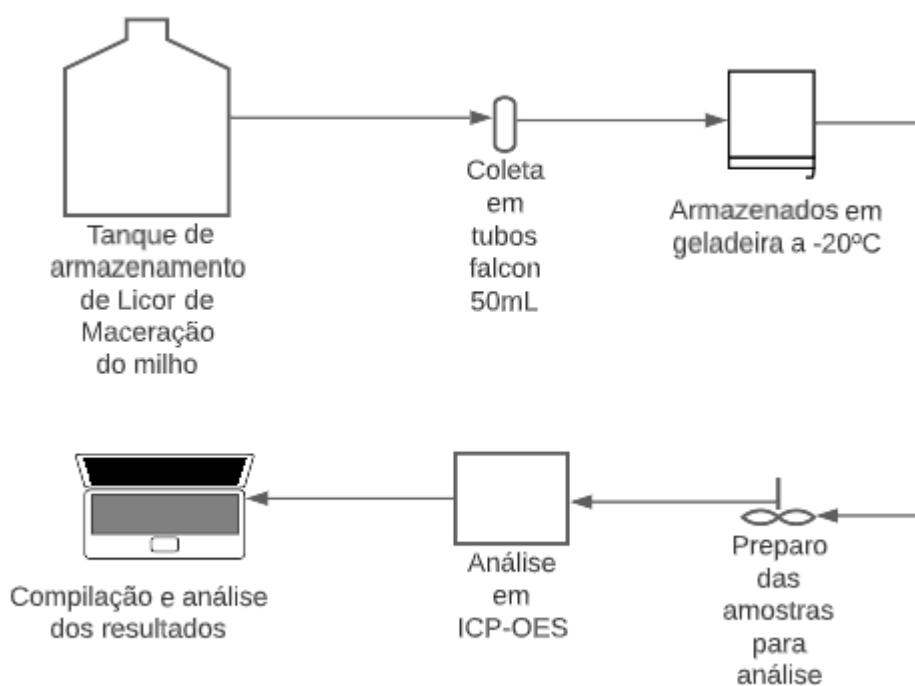
Como complementação, para esse trabalho encontrou-se uma patente francesa, a qual refere-se a uma invenção que consiste em um processo para o tratamento de uma solução de maceração de milho, que permite obter um meio

semelhante a este meio complexo que pode ser facilmente atomizado, e que permanece solúvel após a esterilização. Ou seja, após caracterização do meio, há a possibilidade de criar uma receita para produção de licor de maceração de milho, anulando assim a variabilidade advinda de fatores externos (BOIT, *et al.* 2019).

4 METODOLOGIA

Foram coletadas onze amostras de diferentes lotes de licor de maceração de milho ao longo do tempo, as quais estavam armazenadas em tanque industrial e foram cedidas por uma indústria de biotecnologia, entre o período de 10/01/2022 a 10/03/2022. Para a coleta foram utilizados tubos *falcon* de 50mL cada, em seguida armazenados em geladeira a -20°C até o momento da análise. Amostras de licor consistem em duas fases imiscíveis (uma fase sólida e uma fase líquida). Antes da análise em ICP-OES, as amostras foram homogeneizadas com agitador tipo vortex, para que não houvesse sólidos decantados, que podem causar uma leitura imprecisa.

Figura 7 - Fluxograma de etapas



Fonte: Autoria própria (2022).

Para as medidas instrumentais foi empregado um espectrofotômetro de emissão óptica com fonte de plasma indutivamente acoplada, ICP-OES. Este método é aplicado para a determinação de cálcio, cromo, cobre, ferro, potássio, magnésio, manganês, sódio, fósforo, zinco e outros minerais presentes em amostra e consiste na detecção multielementar que utiliza uma fonte de plasma a uma temperatura elevada para excitar os átomos ao ponto de emitirem fótons de luz de comprimento

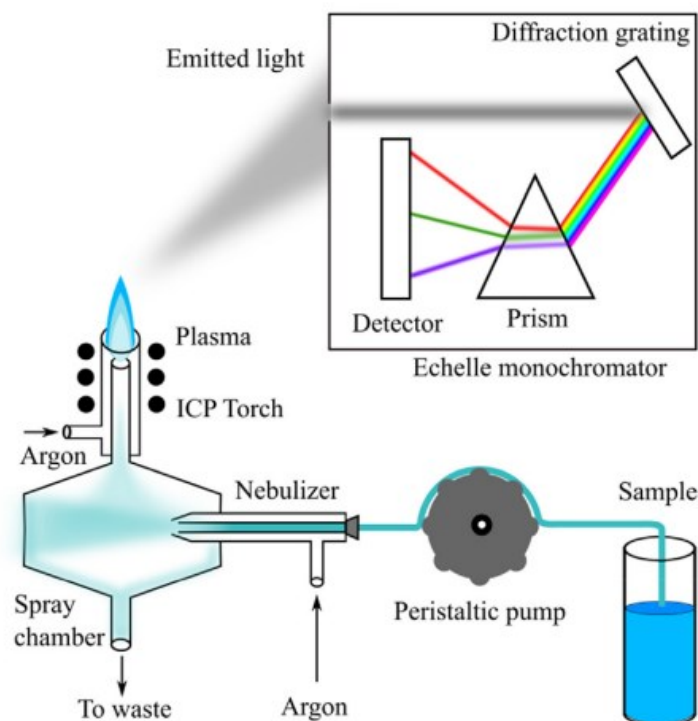
de onda característicos e específicos de um determinado elemento.

A análise foi desenvolvida de acordo com o método 395/IV Determinação de minerais por espectrometria de emissão atômica por plasma de argônio indutivamente acoplado (Métodos físico-químicos para análise de alimentos, Instituto Adolfo Lutz). Além do ICP-OES, foram utilizados para a análise uma balança analítica, estufa, mufla, chapa aquecedora, pipetadores automáticos com volumes ajustáveis, frascos de polietileno, cápsulas de porcelana, balões volumétricos de 25 e 50mL e tubos *falcon* de 50mL. Todos os produtos químicos utilizados foram de grau analítico, sendo eles o ácido clorídrico e ácido nítrico para análise de traços de metais, solução padrão estoque de 1000mg/L ou 10000mg/L dos elementos a serem analisados e água ultrapura.

Para o ajuste do equipamento os parâmetros instrumentais foram otimizados segundo o manual de instruções do fabricante. Durante a preparação das amostras, as cinzas resultantes da digestão da amostra com ácido clorídrico concentrado foram dissolvidas, de tal modo que a concentração final de HCl fosse 10% v/v. Foram transferidas quantitativamente com água destilada e deionizada para balão volumétrico. Para a curva padrão foram preparadas as soluções padrão de trabalho multi-elementar, a partir da solução padrão estoque, com no mínimo seis pontos, levando em consideração a sensibilidade do equipamento e a faixa linear de trabalho para cada elemento. As soluções foram preparadas em meio de ácido clorídrico a 10% v/v. Em seguida foi zerado o equipamento com solução de HCl 10%, e então estabelecido a curva padrão para cada elemento a ser determinado usando regressão linear. Leu-se as amostras e verificou-se a calibração após a análise de 11 amostras, utilizando uma das soluções da curva padrão.

Para o cálculo da concentração do elemento na amostra, em mg/kg ou mg/L, foi utilizada a seguinte fórmula ($L \times b \times d$), onde L = leitura da amostra, em mg/L; b = volume do balão para o qual a cinza da amostra foi transferida, em mL e d = fator de diluição da amostra (quando necessário).

Figura 8 - Esquema simplificado mostrando os princípios operacionais básicos do ICP-OES



Fonte: Adaptado de Encyclopedia of Interfacial Chemistry (CHEREVCO, *et al.* 2018).

Como mostra a Figura 8, a amostra líquida contendo o analíto de interesse (licor de maceração de milho), após digestão, é bombeada por uma bomba peristáltica no sistema de introdução de amostra do ICP-OES, que consiste em um nebulizador e uma câmara de nebulização. No pulverizador, o fluxo é utilizado para romper a interface líquido-gás, formando um aerosol, o qual é então separado, deixando apenas uma parte do líquido para seguir no plasma. Quando o ar é inserido ocorre conseqüentemente a vaporização, atomização e ionização das partículas.

A energia do plasma opera alta o suficiente para excitar os elétrons e emitir fótons de comprimentos de onda característicos para cada elemento a ser analisado. A luz emitida contendo vários comprimentos de onda, é focada em um prisma usado para dividir e separar os espectros em cada comprimento de cada componente.

Informações referentes à concentrações e modelos de equipamentos foram ocultadas deste trabalho, pois são de extrema confidencialidade para a empresa que custeou a análise. Ao término das leituras foi gerado um arquivo com os resultados obtidos, para que então a análise estatística fosse iniciada.

5 RESULTADOS

Foram detectados 17 minerais presentes no licor de maceração de milho. De acordo com a análise estatística realizada observa-se uma variação entre as concentrações dos minerais dos diferentes lotes analisados. Como neste trabalho não observou-se o comportamento de um único microrganismo em relação ao meio, ou seja, cada processo e cada microrganismo vai atuar de forma diferente frente ao meio complexo estudado, vale avaliar qual o impacto dessa variação em diferentes fermentações. Pode-se observar uma variação significativa na amplitude das concentrações mínimas e máximas dos minerais nas amostras analisadas (Tabela 2).

Tabela 2 – Resultados obtidos por ICP-OES para os minerais analisados

Analitos	Concentração Mínima	Concentração Máxima	Média ± Desvio padrão	%CV
Al (mg/kg)	5,16	14,3	10,12 ± 2,74	27
B (mg/kg)	5,65	10,43	7,52 ± 1,19	16
Ca (mg/kg)	161,89	298,38	212,69 ± 34,48	16
Cr (mg/kg)	0,34	0,48	0,4108 ± 0,046	11
Cu (mg/kg)	0,60	5,30	3,82 ± 1,26	33
Fe (mg/kg)	79,15	133,12	103,98 ± 16,15	16
K (g/kg)	16,23	22,85	19,15 ± 1,54	8
Mg (g/kg)	3,51	5,67	4,61 ± 0,55	12
Mn (mg/kg)	24,19	33	26,85 ± 2,41	9
Mo (mg/kg)	1,00	2,05	1,47 ± 0,37	25
Na (g/kg)	0,08	3,09	0,42 ± 0,85	49
Ni (mg/kg)	0,25	0,44	0,32 ± 0,05	16
P (g/kg)	8,87	12,43	10,19 ± 0,87	9
Sr (mg/kg)	0,45	0,69	0,58 ± 0,085	15
Zn (mg/kg)	59,71	95,94	75,46 ± 9,25	12
S (g/kg)	4,58	5,47	5 ± 0,25	5
V (µg/kg)	43,25	77,79	59,84 ± 10,65	18

Fonte: Aatoria própria (2022).

O Gráfico 1 nos mostra o desvio padrão analisado entre todos os dados obtidos para cada mineral através da análise em ICP-OES. Pode-se observar que dentre todos, os que tiveram um maior desvio padrão foram o cálcio, ferro, zinco e vanádio. Não excluindo a variação dos outros elementos, que também podem ser significativas, levando em consideração também o coeficiente de variação, que traz valores altos

para alumínio, cobre e sódio.

Gráfico 1 – Desvio padrão entre as amostras de licor de maceração de milho

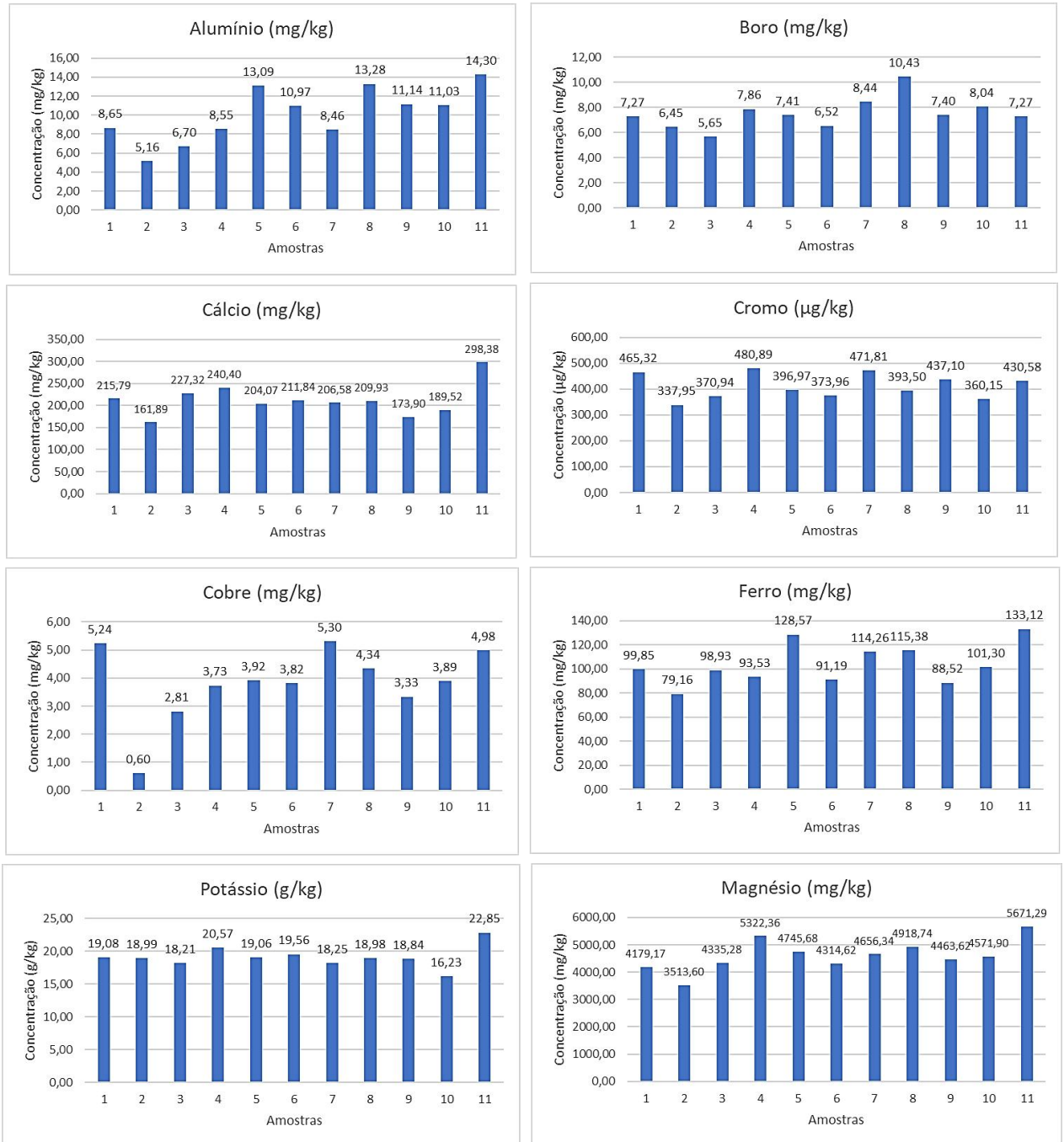


Fonte: Autoria própria (2022).

A variação entre cada mineral apresentada nesta análise também ocorre devido ao processo produtivo do milho, além de outros parâmetros, como modo de cultivo do grão, condições climáticas, qualidade do solo, os quais impactam na qualidade do milho e fazem com que o mesmo carregue mais ou menos de algumas substâncias. Além disso, o processo de maceração úmida pode impactar na concentração de alguns minerais, sendo que 78% dos mesmos estão concentrados no gérmen do milho. O mineral encontrado em maior abundância no milho é o fósforo (0,3 ppm), presente na forma de fitatos de potássio e magnésio. Enxofre ocorre no grão em quantidades significantes, embora na forma orgânica, como parte dos aminoácidos sulfurados (PAES, 2006). Comparando-se o meio de cultivo para crescimento da *Corynebacterium glutamicum*, como descrito por Eggeling (2005), a solução de sais consiste em 80g de $MgSO_4 \times 7H_2O$, 4g de $FeSO_4 \times 7H_2O$, 0,4g de $MnSO_4 \times H_2O$, 5g de NaCl em 1000mL de água. A solução de elementos traços consiste em 88mg de $Na_2B_4O_7 \times 10H_2O$, 40mg de $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \times 4H_2O$, 10mg de $ZnSO_4 \times 7H_2O$, 270mg de $CuSO_4 \times 5H_2O$, 7,2mg de $MnCl_2 \times 4H_2O$, 870mg de $FeCl_3 \times 6H_2O$ em 1000mL de H_2O . Se comparado aos sais do licor de maceração de milho, este meio complexo pode vir a enriquecer o meio de cultivo da bactéria, porém a variabilidade apresentada pode causar uma instabilidade entre as fermentações.

Por se tratar de um meio complexo com concentrações consideráveis de sais, pode-se optar por diminuir a alimentação dos sais do meio de cultivo com a adição de licor de maceração de milho. Esta opção não só vale para os sais, como também para todos os nutrientes presentes no licor. Após quantificação do licor utilizado, pode-se fazer um balanço entre os nutrientes necessários para o crescimento do microrganismo, fazendo a suplementação do meio. A proposta de criar um licor de maceração de milho é válida, caso a variação dos sais possa estar causando muita variabilidade no processo em que ele é empregado. Concentrações maiores ou menores podem impactar significativamente em determinados processos.

Figura 9 – Distribuição da concentração de Alumínio, Boro, Cálcio, Cromo, Cobre, Ferro, Potássio e Magnésio em onze amostras de licor de maceração de milho



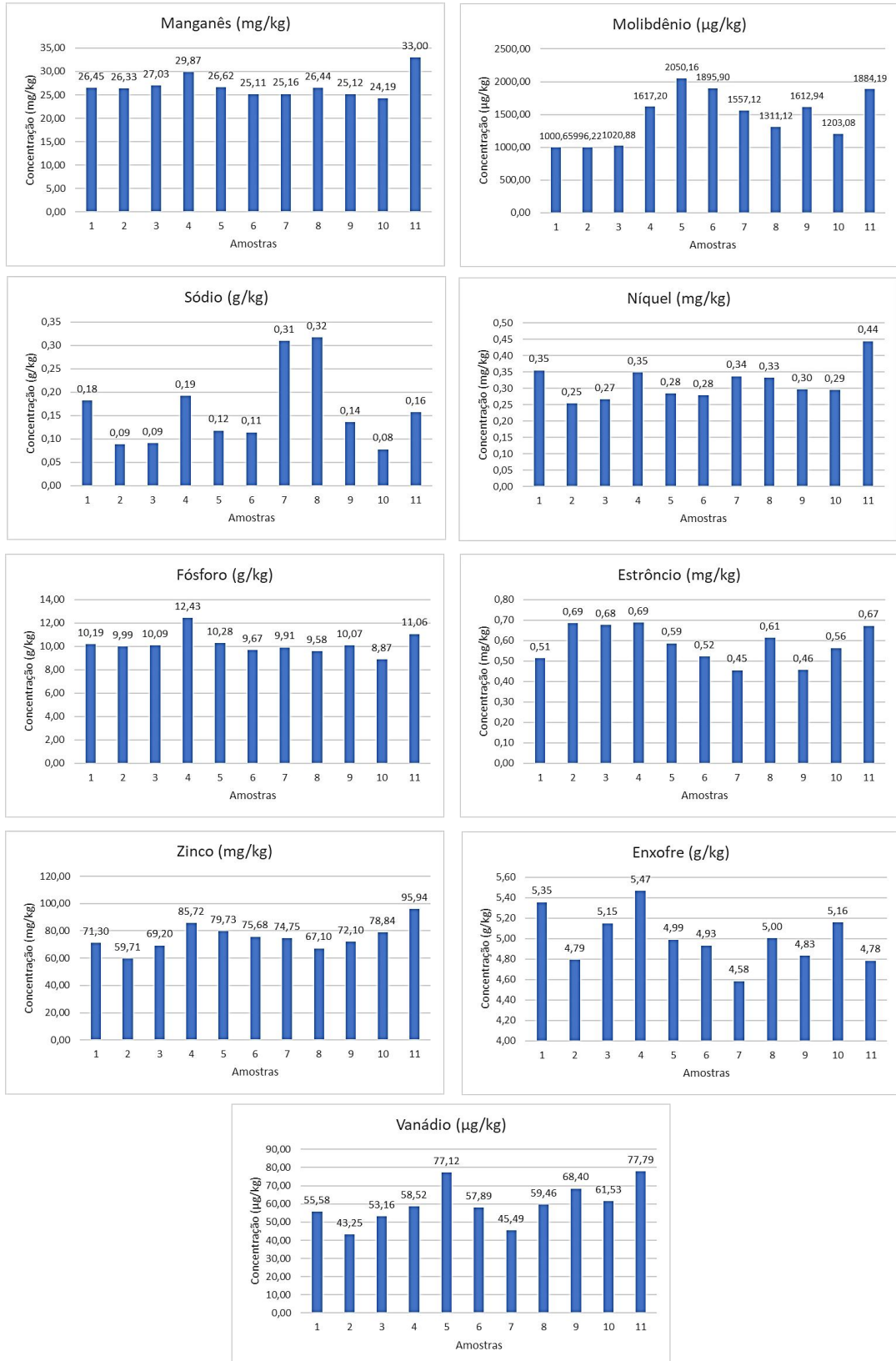
Fonte: Autoria própria (2022).

Em um estudo realizado por El-Marsafy *et al.* (1977), a atividade da penicilina de um meio contendo 2% de superfosfato de cálcio foi maior do que o meio controle, contendo 0,4% de dihidrogenofosfato de potássio e 1% de carbonato de cálcio. Segundo Eggeling *et al.* (2015), o ferro é crítico para o crescimento da *Corynebacterium glutamicum* devido à extrema baixa solubilidade do Fe^{3+} e a

capacidade limitada deste microrganismo em sintetizar e excretar sideróforos. Como no meio de cultivo deste microrganismo há a adição de sulfato de ferro, diferentes concentrações vindas no licor de maceração de milho podem impactar na qualidade da fermentação. Segundo Calam *et al.* (1948), para a produção de penicilina, deve haver uma adição adequada de sais minerais no meio, incluindo magnésio, potássio, ferro, zinco, cobre, manganês, cobalto, fosfato e flúor. A variação destes minerais, causando acúmulo ou falta, pode causar deficiência na fermentação.

De acordo com resultados de um trabalho realizado para avaliar a composição mineral do caldo de cana e sua influência na fermentação do etanol, o magnésio foi o principal responsável pelo aumento do rendimento de etanol, e também parece ser capaz de disfarçar os efeitos inibitórios dos minerais tóxicos presentes no caldo de cana (DE SOUZA *et al.* 2014).

Figura 10 – Distribuição da concentração de Manganês, Molibdênio, Sódio, Níquel, Fósforo, Estrôncio, Zinco, Enxofre e Vanádio em onze amostras de licor de maceração de milho



Fonte: Autoria própria (2022).

Os sais minerais desempenham um papel importante no processo de fermentação e afetam a estabilidade microbiológica. Em um estudo utilizando uma cepa modificada da *Saccharomyces cerevisiae* para produção de bioetanol utilizando como substrato resíduo de manga (*Mangifera indica*), foi suplementado o meio de cultura com diferentes sais nos perfis de fermentação, dentre eles $MgSO_4$, $MnSO_4$, $FeSO_4$ e KH_2PO_4 . A adição dos sais, mais o substrato foi satisfatório, obtendo uma concentração de 21,75g/L de bioetanol (SOMDA *et al.*, 2011).

Ainda segundo Eggeling *et al.* (2015) sobre o cultivo de *Corynebacterium glutamicum*, concentrações externas de zinco podem ser tóxicas para o microrganismo, onde a variação apresentada através do ICP, pode causar impactos na produção de L-Lisina. Os efeitos da suplementação de zinco foram investigados também na fermentação contínua de etanol utilizando levedura autofloculante. Sulfato de zinco foi adicionado nas concentrações de 0,01, 0,05 e 0,1 g/L, respectivamente. Tamanhos médios reduzidos de flocos foram observados em todas as culturas suplementadas com zinco. Tanto a tolerância ao etanol quanto a tolerância térmica foram significativamente melhoradas pelos suplementos de zinco, que se correlacionaram bem com o aumento dos teores de ergosterol e trealose nos flocos de levedura. A suplementação de 0,05 g/L de sulfato de zinco atingiu 114,5 g/L, em contraste com 104,1 g/L na cultura controle. Esses estudos sugerem que adição de zinco exógeno levou a uma reprogramação da rede metabólica celular, resultando em tolerância ao etanol e produção de etanol. (Zhao *et al.* 2009).

Estudos sobre a produção de ácido cítrico em meio de farelo de trigo utilizando *Aspergillus niger* mostraram que a suplementação de farelo de trigo com quantidades adicionais de íons minerais como ferro, cobre, zinco, manganês, magnésio e fósforo foi necessária para aumentar a produção de ácido cítrico. Todos os íons minerais, quando usados individualmente em um nível ótimo, aumentaram a produção de ácido cítrico em 1,4 a 1,9 vezes.

Sabe-se que cada microrganismo se comporta de forma diferente e demanda de diferentes nutrientes para seu crescimento, assim como processos fermentativos possuem diversos produtos finais que podem ser desde a própria biomassa até subprodutos, entre outros que demandam de meios de cultivo diferentes. De acordo com Lima, *et al.* (2001), um meio de cultivo deve, igualmente, fornecer nitrogênio, fósforo, enxofre, potássio, magnésio, cálcio, zinco, manganês, cobre, ferro, cobalto, iodo e outros elementos em quantidades diminutas. Isso nos leva a crer que mínimas

diferenças podem causar impacto aos microrganismos. Como descrito, a sazonalidade entre os lotes de licor de maceração de milho trazem, a cada lote, mudanças nas concentrações de todos os elementos. Para estas amostras em questão, meios que demandam de concentrações específicas dos minerais com maior variação citados acima, podem obter resultados diferentes de produtividade.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As indústrias cada vez mais buscam meios de aumentar sua produtividade investindo em matérias-primas baratas e de alto desempenho. Por isso tem se optado por subprodutos ou até resíduos da indústria agrícola, os quais em sua maioria possuem um alto valor nutricional. O presente trabalho tem como propósito trazer conhecimento sobre o licor de maceração de milho e as vantagens a cerca da sua utilização em processos fermentativos, dando importância à caracterização do meio, com ênfase nos minerais. Este trabalho também aborda a importância de um estudo mais aprofundado sobre a matéria-prima, buscando entender e conhecer melhor sua composição com o objetivo de auxiliar na redução da variabilidade no processo. A análise em ICP-OES ainda não é frequente em todas as indústrias devido ao alto custo do equipamento, sendo assim este trabalho traz informações pertinentes sobre a concentração dos minerais presentes em onze lotes de licor de maceração do milho. É comprovado que a sazonalidade entre os lotes de licor de milho traz impactos em processos microbiológicos, que dependem de um limite de nutrientes específicos para um bom desempenho, vale analisar o quanto essa variação impacta em cada processo e microrganismo utilizado. Vale salientar também, que como descrito no trabalho, há a possibilidade de produzir um licor de maceração de milho como produto primário, priorizando a estabilidade dos nutrientes, como também há a possibilidade de criar um meio sintético, que substitua os nutrientes principais presentes no licor de milho, anulando assim a variabilidade externa causada pelo processamento do milho.

REFERÊNCIAS

- ALBINO, U. B.; CAMPO, R. J. **Efeito de fontes e doses de molibdênio na sobrevivência do *Bradyrhizobium* e na fixação biológica de nitrogênio em soja**, 2000.
- AMARAL, D.; ARANHA, D. **Efeitos Do Alumínio sobre a fermentação alcoólica**. 102f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luís de Queiróz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; LOPES, M. L. **Sugar cane juice and molasses, beet molasses and sweet sorghum: composition and usage**. In W. M. Ingledew, G. D. Austin, C. Kluhspies, & D. R. Kelsall (Eds.), *The alcohol textbook*. Nottingham: Nottingham University Press. 5th ed., pp. 39–46, 2009.
- ANDREWS, N.C. **Forging a field: the golden age of iron biology**. *Blood* 112, 219–230. Austria, 2018.
- BAILEY, SE, *et al.* **A review of potentially low-cost sorbents for heavy metals**. *Water Res.*, 33: 2469-2479.1999.
- BARAL, A., ENGELKEN, R, D. **Chromium-based regulations and greening in metal finishing industries in the USA**, *Environ.Sci. Policy* 5 (2) 121-133, 2002.
- BARRERA, H. *et al.* **Removal of chromium and toxic ions presents in mine drainage by Ectodermis of Opuntia**. *J. Hazard. Mater.*, 136: 846-853. 2006.
- BECKER, T. W. *et al.* **Investigations into microbiology**. In: *Investigations into devices against environments attack on stones*. Hamburg: GKSS-Forschungszens Geesthacht GmbH, 1994.
- BERTINI, I.; GRAY, H. B.; LIPPARD, S. J.; VALENTINE, J. S.; **Bioinorganic chemistry**, 1994.
- BOIT, B.; RAMETTE, M.; SALOME, A.; **Corn Steep Soluble**. Nº de publication: 3 102 176. Nº d’enregistrement national: 19 11683. Date de dépôt: 18.10.19.
- BOLOGNA, I.R. **Adubação barotada em pomar de laranja pêra rio afetado pela clorose variegada dos citros**. Dissertação (mestrado) – Escola superior de agricultura Luiz de Queiroz. Piracicaba/SP, 2003.
- BORTELS, H. Molybdän als Katalysator bei der biologischen Stickstoffbindung. **Archives of Microbiology**, Berlin, v. 1, p. 333-342, 193. 1930.
- CAKMAK, I.; KURZ, H.; MARSCHNER, H. Short-term effects of boron, germanium and high light intensity on membrane permeability in boron deficient leaves of sunflower. **Physiologia Plantarum**, v.95, p-11-18, 1995.

CALAM, C. T.; HOCKENHULL, D. J. D. The Production of Penicillin in Surface Culture, using Chemically Defined Media. **Imperial Chemical Industries Ltd.**, Biological Laboratories, Blackley, Manchester, 1948.

CHEREVKO, S.; MAYRHOFER, K. J. J. On-Line Inductively Coupled Plasma Spectrometry in Electrochemistry: Basic Principles and Applications. *In*: Wandelt, K.,(Ed.) **Encyclopedia of Interfacial Chemistry**: Surface Science and Electrochemistry, vol.1, pp 326–335. 2018.

CHIANI, M.; AKBARZADEH, A.; FARHANGI, A.; MEHRABI, M. R. **Production of Desferrioxamine B (Desferal) using Corn Steep Liquor in Streptomyces pilosus**, 2010.

CONRADO, F. O. **Controle de calemia**. Seminário apresentado pelo aluno Francisco de Oliveira Conrado na disciplina Bioquímica do tecido animal, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Professor responsável pela disciplina: Félix H. D. González, 2010.

CUNHA, M. C.; MASOTTI, M. T.; MONDRAGÓN-BERNAL, O. L.; ALVES, J. G. L. F. **Highly efficient production of l (+)-lactic acid using medium with potato, corn steep liquor and calcium carbonate by *Lactobacillus rhamnosus* atcc 9595**, 2017.

CUNNIFF, P. Association of official analytical chemists: Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 16th ed., v. 1, **Arlington**: A.O.A.C., Chapter 3. p. 4. (method 985.01), 1995.

DATE, R. A.; HOLLIDAY, J. Selecting Rhizobium for acid, infertile soils of the tropics. **Nature**, v.277, n.6, p.62-64, 1979.

DE SILVA, D.M., ASKWITH, C.C., KAPLAN, J. **Molecular mechanisms of iron uptake in eukaryotes**. *Physiol. Rev.* 76, 31–47, 1996.

DE SOUZA, R. B., DE MENEZES, J. A. S., DE SOUZA, R. DE F. R., DUTRA, E. D., & DE MORAIS JR, M. A. Mineral Composition of the Sugarcane Juice and Its Influence on the Ethanol Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 175(1), 209–222. doi:10.1007/s12010-014-1258-7, 2014.

DECHEN, A. R.; HAAG, H. P.; CARMELLO, Q. A. Funções dos micronutrientes nas plantas: mecanismos de absorção e de translocação de micronutrientes. *In*: FERREIRA, M. E.; CRUZ, M.C.(Ed). **Micronutrientes na agricultura**. Piracicaba: Associação Brasileira para Pesquisa da Potassa e do Fosfato. Cap.3, p.65-67, 1991.

DERMOU, E.; VELISSARIOU, A.; XENOS, D.; VAYENAS, D.V.; Biological chromium (VI) reduction using a trickling filter. **Journal of Hazardous Materials B126**, p.78-85, 2005.

EGGELING, L.; BOTT, M.; **Handbook of *Corynebacterium glutamicum***, 2005.

ELIN, R.J. Magnesium: the fifth but forgotten electrolyte. **American Journal of Clinical Pathology**, Philadelphia, v.102, n.5, p.616-622, 1994.

EL-MARSAFY, M., ABDEL-AKHER, M., & EL-SAIED, H. **Efeito da composição da mídia na produção de penicilina**. Zentralblatt Für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten Und Hygiene. Zweite Naturwissenschaftliche Abteilung: Allgemeine, Landwirtschaftliche Und Technische Mikrobiologie, 132(2), 117–122. doi:10.1016/s0044-4057(77)80053-1, 1977.

FERREIRA, J. M.; SILVA, F. L. H.; ALSINA, O. L. S.; OLIVEIRA, L. S. C.; CAVALCANTI, E. B. C.; GOMES, W. C. **Equilibrium and kinetic study of pb²⁺ biosorption by *Saccharomyces cerevisiae***, 2007.

FORMIGHIERI, F. F. **Bioinformática e anotação de genes em *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* e *Xylella fastidiosa*: metabolismo de ferro e biossíntese de pequenas moléculas**. Dissertação (mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, 2002.

FOY, C. D.; GERLOFF, G. C. Response of *Chlorella pyrenoidosa* to aluminum and low pH. *Journal Phycology*, v.8, n.2, p. 268-271. G. M. Gadd, **FEMS Microbiol. Lett.** 100 (1992) 197–204, 1972.

GOVENDER, D. **The purification of corn steep liquor as a fermentation feedstock by ultrafiltration**. Department of Chemical Engineering, Durban University of Technology, 2008.

GRAHAM, R. D.; WEBB, M. J. Micronutrients and disease resistance and tolerance in plants. In: MORTVEDT, J.J.; COX, F.R. SHUMAN, C.M.; WILCH, R. M. (Ed). **Micronutrients in agriculture**. Madison: Soil Science Society of America Book Services. Cap.10, p.329-370, 1991.

GRASSI FILHO, H. **Níveis de cálcio e boro e suas interações, afetando o desenvolvimento do sistema radicular, a composição mineral e o vigor do limoeiro Cravo (*Citrus limonia* (L) OSBECK), em condições controladas**. Piracicaba. 92p. Dissertação (mestrado) – Escola superior de agricultura “Luiz de Queiroz”, USP, 1991.

GROTTO, H. Z. W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** 2008;30(5):390-397.

GUERRA, T. A. **Cobre: deficiência e intoxicação**. Seminário apresentado pela aluna Tatiana Amaral Guerra na disciplina Transtornos metabólicos dos animais domésticos, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Professor responsável pela disciplina: Félix H. D. González, 2008.

GUIDA, L.; SAIDI, Z.; HUGHES, M. N.; POOLE, R. K. Aluminum toxicity and binding to *Escherichia coli*. *Archives of Microbiology*, v.156, n.9, p.507-512, 1991.

HAMANOB, P. S.; KILIKIAN, B. V. **Production of red pigments by *Monascus ruber* in culture media containing corn steep liquor**, 2006.

HENTZE, M.W. *et al.* (2004) **Balancing acts**: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* 117, 285–297.

HOFER, A; HAUER, S; KROLL, P; FRICKE, J; HERWIG, C. **In-depth characterization of the raw material corn steep liquor and its bioavailability in bioprocesses of *Penicillium chrysogenum***. Research Area Biochemical Engineering, Institute of Chemical, Environmental and Bioscience Engineering, Vienna University of Technology, Gumpendorferstrasse 1a - 166/4, A-1060 Vienna, 2018.

J. M. BERG, J. L. TYMOCZKO, L. **Stryer**: Biochemistry, WH Freeman and Company, New York, pp. 270,465,687, 2002.

JACKSON, DS, & SHANDERA, DL. **Moagem úmida de milho**: química e tecnologia de separação. *Advances in Food and Nutrition Research*, 271–300. doi:10.1016/s1043-4526(08)60085-6, (1995).

KARAFFA, L.; KUBICEK, C. P.; **Acúmulo de ácido cítrico por *Aspergillus niger***: entendemos essa caixa preta que funciona bem? *Appl Microbiol Biotechnol*;61(3):189–96, 2003.

KEEN, C. L.; ENSUNSA, J.L.; CLEGG, M.S.; **Metabolismo do manganês em animais e humanos, incluindo a toxicidade do manganês**. *In*: Sigel A, Sigel H, editores. Íons metálicos em sistemas biológicos. Nova York: Marcel Dekker. pág. 89-114, 2000.

KOCHIAN, L. V. Cellular mechanisms of aluminum and resistance in plants. **Annual Review Plant Physiology**, v.46, n.9, p.237-260, 1995.

LAWFORD, H. G.; ROUSSEAU, J. D. **Corn steep liquor as a cost-effective nutrition adjunct in high-performance *Zymomonas ethanol* fermentations**, 1997.

LENOBLE, M.E. ; BLEVINS, D. G.; MILES, R. J. Extra boron maintains root growth under toxic aluminum conditions. **Better crops**, p. 3-5, Summer, 1993.

LETTI, L. A. J. **Produção de l-lisina por processos fermentativos e desenvolvimento de produto para nutrição animal**. Tese para obtenção do grau de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

LIMA, U.A. *Aguardentes*. *In*: AQUARONE, E. *et al.* (Coord.). **Biotecnologia Industrial**: alimentos e bebidas produzidos por fermentação. São Paulo, Edgard Blücher, v. 4, p.145 – 182, 2001.

LOPES, J. J. C. **Balço de nutrientes minerais no processo Melle-Boinot de fermentação alcoólica**. Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, 1989.

LORENZI, L. **La pulitura dei materiali lapidei da costruzione e scultura: metodi industriali e di restauro**. Padova: CEDAM, 1981.

MERIÑO-GERGICHEVICH, C.; MORINA, F.; JORQUERA-FONTENA, E.; SEGUEL, A. **Differential Tolerance and Phenolic Leaf Profile in Response to Boron Supply in Two Highbush Blueberry Genotypes**. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, Tokyo, v.1, p.1-9, 2019.

MERIÑO-GERGICHEVICH, C.; REYES – DIAZ, M.; GUERRERO, J.; ONDRASEK, G. **Physiological and nutritional responses in two highbush blueberry cultivars exposed to deficiency and excess of boron**. Journal of Soil Science and Plant Nutrition, Tokyo, v.17, n.2, p.307-318, 2017.

SANTOS, E. V. M.; FILHO, H. A. S.; HAANDEL, A. C. V.; SOUSA, J. T. **Metabolic capacity of heterotrophic bacteria of activated sludge systems in aerobic and anoxic environments**, 2020.

STEINKE, J. JOHNSON, L. WANG, C. **Steeping maize in the presence of multiple enzymes. ii, continuous conutercurrent steeping**. Published 1 February 1991.

MOHAN, D. *et al.* **Trivalent chromium removal from wastewater using low cost activated carbon derived from agricultural waste material and activated carbon fabric cloth**. J. Hazard. Mater., 135: 280-295, 2006.

MUCKENTHALER, M. U.; GALY, B.; HENTZE, M. W. Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 28, p. 197-213, 2008.

NOLASCO, R. X. **Influência do magnésio nos processos fermentativos de resíduos hidrolisados da cultura da bananeira**. Dissertação (mestrado acadêmico) – Universidade Federal de Tocantins – Câmpus Universitário de Palmas – Curso de Pós Graduação (Mestrado) em Agroenergia, 2017.

NORRIS, V.; GRANT, S.; FREESTONE, P.; CANVIN, J.; SHEIKH, F. N. TOTH, I.; **Calcium signalling in bacteria**. J Bacteriol 178: 3677-3682, 1996.

PAES, M. C. D. Aspectos físicos, químicos e tecnológicos do grão do milho. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Embrapa**. Sete Lagoas, MG. Dezembro, 2006.

R. P. JONES, G. M. GADD, **Enzyme Microb. Technol.** 12 1–17, 1990.

RAHMAN, S. RASOOL, M. H. RAFI, M. **Penicillin production by wild isolates of *penicillium chrysogenum* in pakistan**. Institute of Microbiology, University of Agriculture, Faisalabad, Pakistan; Department of Microbiology, Govt. College University, Faisalabad, Pakistan, 2012.

REDDI A.R., JENSEN L.T., CULOTTA V.C. **Homeostase do manganês em *Saccharomyces cerevisiae***. Chem Rev;109(10):4722–32, 2009.

RESENDE, M. A. Biodeterioração de monumentos históricos. *In*: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Microbiologia ambiental. Jaguariúna: **EMBRAPA-CNPMA**, 1997.

ROQUETTE. **SOLULYS®: The Difference Between a Defined Product and “CSL By-Product”**. Disponível em: <https://www.roquette.com/media-center/resources/bio-industry-scientific-poster-solulys-difference-between-defined-product-and-csl-by-product#:~:text=The%20SOLULYS%C2%AE%20process%20differentiates,performance%20compared%20to%20Yeast%20Extracts..> Acesso em: 21 mai. 2022.

SARGENT, P.J., FARNAUD, S., EVANS, R.W., 2005. **Structure/function overview of proteins involved in iron storage and transport**. Curr. Med. Chem. 12, 2683–2693, 2005.

SHARMA, N., PRASAD, GS, & CHOUDHURY, AR. **Utilização do licor de maceração de milho para biossíntese de pululano, um importante exopolissacarídeo**. Polímeros de Carboidratos, 93(1), 95-101, 2013.

SHELP, B.J. Physiology and biochemistry of boron in plants, *In*: GUPTA, U.C. **Boron and its role in crop production**. Boca raton: CRC Press. Cap 4, p. 53-85, 1993.

SHU, P., JOHNSON, M.J. **Efeito da composição do meio de esporulação na produção de ácido cítrico por *Aspergillus niger* em cultura submersa**. J Bacteriol;54:161–7, 1947.

SHU, P., JOHNSON, M.J. **A interdependência dos constituintes do meio na produção de ácido cítrico por fermentação submersa**. J Bacteriol;56(5):577-85, 1948.

SMITH, R. J. **Calcium and bacteria**. Adv Microb Physiol 37: 83-133, 1995.

SOUZA, R. B.; MENEZES, J. A. S.; SOUZA, R. F. R.; DUTRA, E. D.; MORAIS J.R, M. A. Mineral Composition of the Sugarcane Juice and Its Influence on the Ethanol Fermentation. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 1, p. 209–222, 2014.

SOMDA, M. K.; SAVADOGO, A.; BARRO, N.;THONART, P.; TRAORE, A. S.; **Effect of minerals salts in fermentation process using mango residues as carbon source for bioethanol production**. Asian Journal of Industrial Engineering, 2011.

STEHLIK-THOMAS, V.; ZETIC, V. G.; STANZER, D.; GRBA, S.; VAHCIC, N. Zinc, Copper and Manganese Enrichment in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Technology and Biotechnology**, 42. p115–120, 2004.

TAIWO, A. E.; MADZIMBAMUTO, T. N.; OJUMU. T. V. **Optimization of Corn Steep Liquor Dosage and Other Fermentation Parameters for Ethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae* Type 1 and Anchor Instant Yeast**. Department of Chemical Engineering, Cape Peninsula University of Technology, Cape Town 8000,

South Africa, 2018.

VAN DER PLOEG, J.R., EICHHORN, E. & LEISINGER, T. **Sulfonate-sulfur metabolism and its regulation in *Escherichia coli***. Arch Microbiol 176, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s002030100298>, 2001.

WANG, Y.; SHEN, H. **Modeling Cr (VI) reduction by pure bacterial cultures**. Water Res. 31 (4), p.727-732, 1997.

WELCH, S. **Transferrin: The Iron Carrier**. CRC Press, Boca Raton, USA, 1992.

YAMAUCHI, T.; HARA, T.; SONODA, Y. **Effects of boron deficiencies and calcium supply on the calcium metabolism in tomato plant**. Plant and soil, v.93, n.223/231, 1986.

ZAGO, M. A. *et al.* **Tratado de hematologia**. São Paulo: Editora Atheneu. p. 137-150, 2013.

ZEL, J.; SVETEK, J.; CRNE, H.; *et al.* Effects of aluminum on membrane fluidity of the mycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. **Physiology Plantarum**, v. 89, n.3, p. 172-176, 1993.

ZHAO, X.; CONDRUZ, S.; CHEN, J.; JOLICOUER, M. **A quantitative metabolomics study of high sodium response in *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 acetone-butanol-ethanol (ABE) fermentation**, 2016.

ZHAO, X.Q.; XUE, C.; GE, M. X.; YUAN, W. J.; WANG, J.Y.; BAI, F.W.; **Impact of zinc supplementation on the improvement of ethanol tolerance and yield of self-flocculating yeast in continuous ethanol fermentation**, 2008.