

MARIA PAULA ASSIS YAMADA

ESTUDO SOBRE A UTILIZAÇÃO  
DO RESÍDUO DE CERVEJARIA E MELAÇO  
NA PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLUCÔNICO

Tese apresentada ao Departamento de Bio-  
química, Universidade Federal do Paraná,  
para a obtenção do Grau de Mestre.

CURITIBA

1986

Orientador:

*Dr. Annibal de Paiva Campello*

Co-orientador:

*Prof. Bonifácio José Gallotti*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Annibal de Paiva Campello, pela orientação e atenções.

Ao Prof. Bonifácio José Gallotti, pelo total apoio, carinho e incentivo durante todas as fases do trabalho.

À Prof.<sup>a</sup> Sonia S. Sonehara Renaud, pela amizade e inestimável colaboração.

À Disciplina de Enzimologia e Tecnologia de Fermentações, pela acolhida calorosa e apoio recebidos durante a parte experimental deste trabalho.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. Kazuko H. do Nascimento, pela incrível boa vontade e extraordinária paciência na reorganização do trabalho original.

À Prof.<sup>a</sup> Dea Ferreira do Amaral, por sua ajuda e sugestões.

Ao Prof. Aguinaldo do Nascimento, por todo o trabalho de estatística.

Ao TECPAR, nas pessoas do Prof. Mario de O. Branco Filho, Jorge Victor B. Agottani e Carlos Antonio Fior, por auxiliarem e facilitarem a execução do trabalho.

*À minha família, pelo permanente apoio e incentivo.*

*Ao Aulio C. Zambenedetti e à Milene Dutra, pelo equipamento de desenho.*

*À Sra. Idilia Tulio Baggio, pela paciência e dedicação no trabalho de datilografia.*

*A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, colaboraram para que este trabalho fosse possível.*

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	iii
LISTA DE FIGURAS .....	viii
RESUMO .....	x
1 INTRODUÇÃO .....	01
2 OBJETIVOS .....	13
3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	14
3.1 MATERIAIS .....	14
3.1.1 Trub .....	14
3.1.2 Melaço .....	14
3.1.3 Microorganismo .....	14
3.1.4 Enzimas .....	15
3.1.5 Reagentes .....	15
3.1.6 Aparelhos e materiais .....	15
3.2 MÉTODOS .....	16
3.2.1 Determinação da composição do TRUB .....	16
3.2.1.1 Determinações físico-químicas ...	16
3.2.2 Determinação quantitativa dos componentes do TRUB .....	16
3.2.2.1 Nitrogênio total .....	16
3.2.2.2 Componente mineral .....	17
3.2.2.3 Determinação quantitativa de açú- cares .....	17

3.2.2.4	Detecção de açúcares no extrato aquoso do TRUB .....	17
3.3	HIDRÓLISE DE CARBOHIDRATOS DO TRUB .....	18
3.3.1	Hidrólise ácida .....	18
3.3.2	Hidrólise enzimática .....	18
3.4	ESTABILIDADE NA CONSERVAÇÃO DO TRUB .....	18
3.5	EXTRAÇÃO AQUOSA .....	19
3.5.1	Extração aquosa de nutrientes do TRUB ....	19
3.5.2	Determinação de proporção TRUB:água .....	19
3.5.3	Determinação do tempo de maceração .....	19
3.5.4	Efeito da temperatura na extração aquosa do TRUB .....	20
3.6	MANUTENÇÃO DO MICROORGANISMO .....	20
3.7	PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO .....	21
3.8	PREPARO DOS MEIOS PARA FERMENTAÇÃO .....	21
3.8.1	Meio de Moyer .....	21
3.8.2	Meio de Moyer substituído .....	22
3.8.3	Meio de TRUB .....	22
3.8.4	Meio de TRUB acrescido de CaCO <sub>3</sub> .....	22
3.8.5	Meio de TRUB contendo melaço .....	22
3.8.6	Meio de melaço .....	22
3.9	FERMENTAÇÃO .....	23
3.9.1	Coleta do material .....	23
3.10	IDENTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS FORMADOS DURANTE A FERMENTAÇÃO .....	24
3.11	REUTILIZAÇÃO DOS MICÉLIOS DE <i>Aspergillus niger</i> EM CULTURA SEMICONTÍNUA .....	26

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	27
5	CONCLUSÕES .....	59
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	61

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Estabilidade do conteúdo de ART durante a conservação do TRUB em diferentes temperaturas ..	30
Figura 2	- Curva de hidrólise ácida do TRUB seco em função de tempo .....	32
Figura 3	- Curva de hidrólise enzimática (celulase) do TRUB seco em função do tempo .....	33
Figura 4	- Esporulação do <i>Aspergillus niger</i> em macerado, utilizando-se água deionizada e de torneira ..	36
Figura 5	- Determinação do tempo de extração de ART do TRUB .....	37
Figura 6	- Detecção de açúcares no extrato aquoso do TRUB	38
Figura 7	- Espectro de absorção da suspensão de esporos de <i>Aspergillus niger</i> em colorímetro Coleman Júnior .....	41
Figura 8	- Curva de calibração (absorbância contra número de esporos) .....	42
Figura 9	- Fermentação da glicose (12,5%) pelo <i>Aspergillus niger</i> em meio de Moyer .....	45
Figura 10	- Fermentação dos açúcares do melaço pelo <i>Aspergillus niger</i> em meio de Moyer substituído ...	46
Figura 11	- Fermentação dos açúcares presentes no TRUB pelo <i>Aspergillus niger</i> .....	49



Figura 12 - Fermentação dos açúcares pelo <i>Aspergillus niger</i> em meio de TRUB acrescido de $\text{CaCO}_3$ .....	50
Figura 13 - Fermentação do TRUB com melaço pelo <i>Aspergillus niger</i> .....	53
Figura 14 - Fermentação do melaço pelo <i>Aspergillus niger</i> em meio contendo somente o melaço .....	54
Figura 15 - Produção de ácido glucônico por <i>Aspergillus niger</i> utilizando o macerado de TRUB sob condições semi-contínuas (reutilização do micélio)	57
Figura 16 - Fermentação de açúcares do TRUB e no melaço em diferentes condições, pelo <i>Aspergillus niger</i> ..	58

## RESUMO

Estudou-se a produção do ácido glucônico por *Aspergillus niger*, utilizando-se, inicialmente, o macerado do resíduo de cervejaria "TRUB", como matéria prima.

Este contém várias substâncias na sua composição: açúcar total 4% (açúcar redutor 3,9% e não redutor 0,1%); Nitrogênio 0,96%; Fósforo 0,074%; Potássio 0,0013%; Magnésio 0,0049% e Cálcio 0,0006%. O pH em torno de 5,5 a 6,0. Entre os açúcares temos a glicose, maltose, galactose, sacarose e outros oligossacarídeos não caracterizados. A hidrólise ácida ou enzimática do trub "*in natura*" resulta no aumento de 3,3 vezes em teor de açúcar redutor.

O trub foi estocado a  $-15^{\circ}\text{C}$  e o macerado obtido por extração aquosa (1:2) foi utilizado como meio de crescimento e fermentação. O microorganismo cresce e esporula melhor no meio de trub acrescido de ágar do que no meio de Czapeck; em processos fermentativos estacionários e sem aeração mecânica efetuada a temperatura de  $29^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ , utilizando-se apenas o macerado de TRUB como nutriente, obteve-se 56 mEq/l de ácido glucônico. A utilização de  $\text{CaCO}_3$  não promoveu aumento significativo na produção de ácido. A reutilização do micélio em fermentações sucessivas, manteve os níveis de produção do ácido, porém, com redução do tempo em até 47%.

A utilização do melaço como fonte de açúcar na suplementação do meio de trub resulta na produção de ácido superior à soma das quantidades produzidas por eles isoladamente (55 mEq/l para o trub, 255 mEq/l para o melaço e 313 mEq/l para a associação do melaço com o trub).

## 1. INTRODUÇÃO

O ácido glucônico, juntamente com seus sais, tornaram-se importantes produtos devido suas utilizações na Medicina, Farmácia, Alimentos, na Química e na Indústria em geral.

O gluconato ferroso, devido às suas propriedades não irritantes, é uma excelente fonte de ferro no tratamento de anemia nutricional e na terapia do ferro. É ainda altamente efetivo no tratamento de anemia secundária, e de grande eficiência na introdução de elementos "*traços*" da dieta (59).

O gluconato de cálcio mostrou-se eficaz agente terapêutico no tratamento de moléstias causadas ou agravadas pela deficiência de cálcio. Este sal é ainda, útil como adjuvante em injeções intramusculares de uma solução de d-tubocurarina que são utilizadas no tratamento de espasmos infantis. Gluconato de cálcio e gluconato de magnésio também são utilizados com ingredientes de dentifrícios. O de magnésio foi reportado como sendo muito efetivo no tratamento de dismenorréias, enquanto que Bernhard (13) reportou a utilização do gluconato de potássio no tratamento de hipopotassemia (59).

Preparações de gluconato de efedrina, demonstraram ser menos irritante do que o sulfato de efedrina normalmente utilizado. Pode-se preparar um preservativo eficaz do sangue humano ou animal utilizando-se ácido glucônico e aminas alifáticas terciárias (59).

O gluconato de clorhexidina é atualmente bastante utilizado como antisséptico em produtos oftálmicos (19).

A inclusão de pequenas quantidades de ácido glucônico em alimentos conservados à base de gorduras ou óleos, vegetais ou animais, resulta em produtos mais estáveis, menos sujeitos à rancificação. Em panificação, a glucono-lactona causa uma liberação de dióxido de carbono mais gradual, produzindo uma massa mais uniforme (59).

Uma alimentação suplementada com gluconato de cálcio previne e cura a diarreia em bezerros e revelou-se satisfatória para a alimentação de galinhas. A qualidade das cascas de ovos é melhorada com sua inclusão na ração (59). Impede o escurecimento de produtos de batata (59).

O ácido glucônico tem larga aplicação na indústria de Laticínios para impedir a formação de crostas no leite e como constituinte ácido na lavagem dos latões de leite. É utilizado com finalidade semelhante na indústria de Cervejaria (59).

Na indústria têxtil, emprega-se o ácido glucônico, glucono-lactona e o gluconato de amônia em larga escala como catalisador, devido ao fato de serem atóxicos, não amaciantes e não corrosivos (59).

Na impressão, tanto o ácido glucônico como o gluconato de amônia têm sido usados para a obtenção do meio ácido, necessário ao desenvolvimento dos esteres corantes (59).

No campo dos detergentes, utiliza-se o ácido glucônico e seus derivados em virtude de sua ação sequestrante em meio alcalino (59).

A indústria do couro utiliza o ácido glucônico ou o gluconato de sódio com vantagens, sobre o curtimento com alúmen

ou ferro, uma vez que os hidróxidos destes dois metais são impedidos de precipitar antes que o ponto isoelétrico do couro seja alcançado. O gluconato de titânio provou ser muito útil na preparação do couro branco (59).

O gluconato de sódio e a glucono-lactona encontram utilidade na indústria fotográfica, na preparação de misturas mais estáveis sob condições atmosféricas mais diversas, além do que, a propriedade sequestrante dos gluconatos impede a precipitação de hidróxidos metálicos na revelação. O ácido e a lactona são ainda utilizados na preparação de placas litográficas (59).

No tratamento de águas, utiliza-se o ácido glucônico e seus sais, particularmente o gluconato de sódio, para impedir a corrosão e a formação de crostas. Operações de galvanoplastia e eletroconservação também são desenvolvidas utilizando-se o ácido glucônico (59).

A adição de gluconato de sódio às tintas solúveis em água impede reflexos e variações de cor (59).

Muitos métodos de preparação do ácido glucônico e seus sais são descritos em literatura, entre estes podemos citar: a oxidação química da glucose por hipoclorito e hipobromito em meio alcalino; outro processo é a oxidação eletrolítica de soluções alcalinas de glucose em presença de iodo (59).

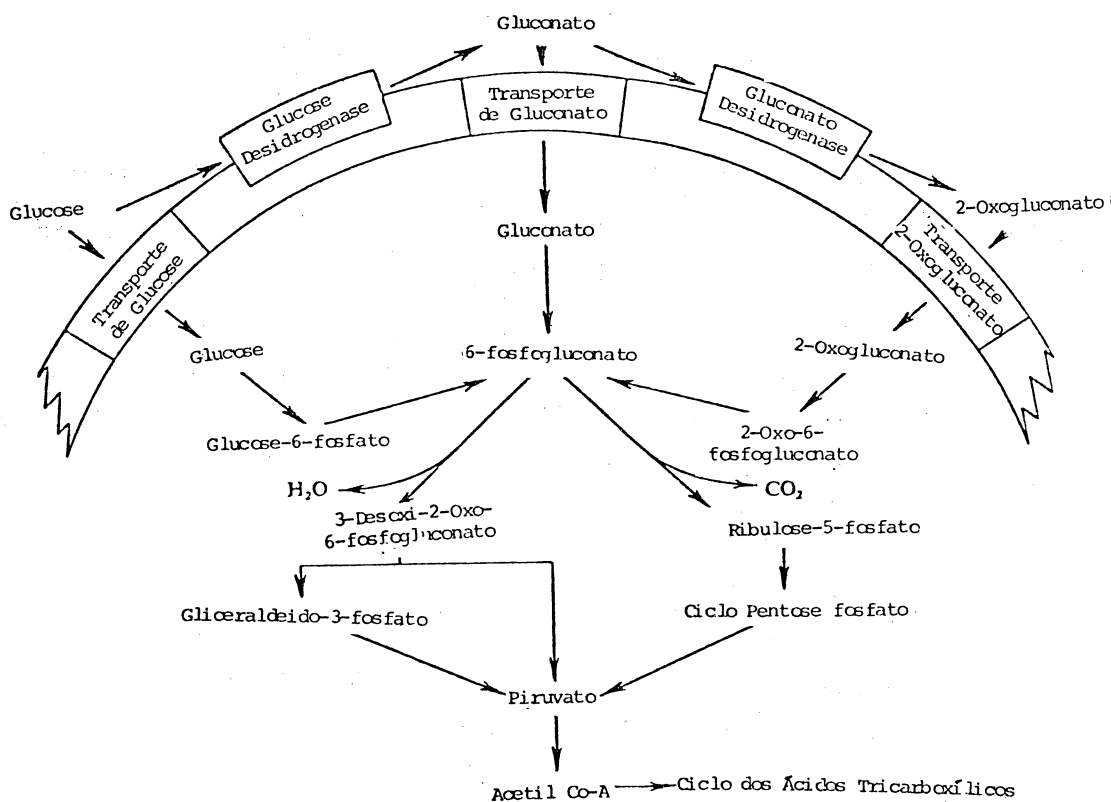
Entretanto, o processo de produção de ácido glucônico mais prático e mais econômico é sem dúvida o processo biológico.

Segundo Foster (26) a produção de ácido glucônico por oxidação microbiana foi relatada pela primeira vez por Boutroux, no ano de 1880, em culturas de *Acetobacter aceti*. Em 1887, o mesmo autor reportou que outras bactérias tinham a ca-

pacidade de produzir o ácido glucônico (26).

A maioria das bactérias como Pseudomonas, Acinetobacter e Xantomonas produzem o ácido glucônico como intermediário na formação de ácidos ceto-glucônicos. O *Acetobacter suboxidans* produz o ácido 5-cetoglucônico às expensas da glucose, ocorrendo a conversão de 100% em quatro dias (18).

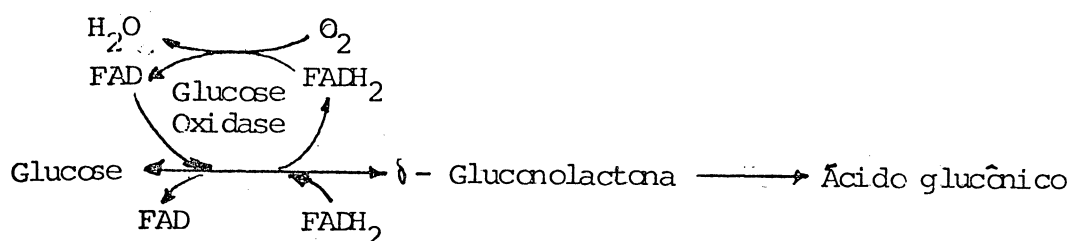
Nas *Pseudomonas*, o gluconato é um intermediário na formação de cetogluconato e fosfogluconato, sendo a via frequentemente encontrada a seguinte:



Na etapa inicial a glicose é oxidada pela glucose desidrogenase (extracelular ou ligada à membrana) dando o gluconato, que por sua vez sofre nova desidrogenação catalisada pela

gluconato desidrogenase, também extracelular ou ligada à membrana; os produtos podem ser utilizados pelo microorganismo via fosforilação dos açúcares seguindo a via das pentoses fosfato, via de Entner Doudoroff, e metabolizar os mesmos via ciclo dos ácidos tricarboxílicos (18, 60).

Em fungos, a via de oxidação da glucose a ácido glucônico é semelhante à das bactérias e foi observado inicialmente por Muller em *Aspergillus niger*, em que a oxidação da glucose envolvia o consumo de oxigênio e a enzima foi denominada glucose-oxidase. Em 1942, um grupo de ingleses (20, 21) isolou um princípio ativo de *Penicillium notatum* com ação antibiótica e denominou de Notatina. Estudos posteriores demonstraram que a notatina catalisava a transformação da glucose em gluconolactona graças à oxidação direta pelo oxigênio (12, 21, 37, 38 e 39) como é mostrada na equação abaixo:



A gluconolactona resultante sofre hidratação, dando o ácido glucônico (2).

A oxidação da glucose sem a participação direta de oxigênio tem sido observado em *Aspergillus oryzae* (53), sendo a enzima induzida por hidroquinona e por benzoquinona (4) contendo como grupo prostético Pirrolquinolinaquinona; nem o FAD nem o NAD(P) são os aceitadores de hidrogênio.

Em 1946, Bose (16) publicou um trabalho onde concluía que a oxidação da glucose a ácido glucônico era devido tanto a



glucose-oxidase quanto a glucose desidrogenase e, segundo ele, ambas as enzimas podem agir independentemente, porém o efeito seria aditivo. A localização celular das enzimas que participam do processo oxidativo é a membrana plasmática e são liberadas ao meio do cultivo.

A descoberta da produção de ácido glucônico por fungos filamentosos deve-se a Molliard em 1922 (48), que estudou as condições ótimas para a fermentação. Embora estivesse restrito a uma única cepa, este trabalho foi de grande importância: demonstrou que controlando-se a composição do meio, o microorganismo podia ser induzido a formar apenas ácido glucônico, cítrico ou oxálico; ou combinações destes ácidos; ou não formar virtualmente ácidos orgânicos. Com um meio balanceado, de modo a se obter um crescimento máximo, apenas traços de ácidos foram detectados. Diminuindo-se a quantidade de nitrogênio, obtinha-se um baixo peso miceliar, mas a produção de ácido era altamente favorecida. Concluiu-se que a formação do ácido dava-se às expensas da síntese celular.

Com base neste trabalho, Bernhauer e Schuhof, 1932 (14) patentearam um processo para a produção de ácido glucônico: no primeiro estágio o *Aspergillus niger* era cultivado em meio nutritivo; após o desenvolvimento do micélio, este era utilizado para oxidar uma solução de glucose.

Estudos sobre a produção de ácido glucônico foram realizados por Wells et al. (71,34) com relação ao efeito da pressão, agitação-aeração, tamanho do inóculo e composição do meio, utilizando o *Aspergillus niger* cepa 67, com concentração de glucose entre 15 a 20%.

Porges et al. (57) utilizaram um processo semi-contínuo

com reutilização do micélio; o mesmo micélio de *Aspergillus niger* foi utilizado até 13 vezes para fermentar uma solução de glucose a 13%, sem contudo perder a atividade. Este processo é útil pois elimina o período de lag na etapa inicial de germinação do fungo.

Moyer et al. (50) apresentaram em 1940 um processo de fermentação de soluções concentradas de glucose utilizando um meio de cultivo onde o boro, impedia a precipitação do gluconato de cálcio, permitindo o uso de soluções com até 25-30% de glucose sem que ocorresse a inibição de fermentação pela precipitação do gluconato de cálcio ou provocasse danos no organismo fermentador pela exposição ao ácido glucônico.

Em 1941, Porges et al. (58), otimizaram o processo de reutilização do micélio, possibilitando a remoção de todo o ácido formado. Até então, o processo utilizado provocava uma perda de cerca de 20% do produto obtido.

Blom et al. (15) em 1952, publicaram um trabalho sobre a produção comercial de gluconato de sódio, utilizando o *Aspergillus niger* NRRL-3 em fermentação submersa e como substrato utilizavam glucose comercial e o produto obtido possuía um grau de pureza de até 99%.

Prescott et al. (59) citam em sua revisão sobre o ácido glucônico e seus derivados, a produção por fermentação a partir de "corn sugar". Uma patente de Pabst Brewing Co. de 1973 (29), cita a produção de ácido glucônico gluconato de sódio, utilizando-se glucose e *Aspergillus niger*, com 98% de conversão a gluconato de sódio.

Em 1976, Mahmoud et al. (44) realizaram estudos sobre os fatores nutricionais que têm influência na produção de áci-

do glucônico em *Aspergillus niger* NRRL-3 e observaram que a concentração ideal de glucose era de 13%, e que o xarope de glucose representa uma fonte barata de açúcar, podendo substituir a glucose em pó.

Após isto, pouco ou nada foi encontrado sobre a produção de ácido glucônico ou seus sais por fermentação. No Brasil, cita-se produtos como gluconato de sódio e gluconato de cálcio de indústrias como Sandoz ou Pfizer, sem contudo ser possível saber-se a existência ou não da produção da referida substância pelas mesmas.

Atualmente, com o grande número de resíduos industriais e domiciliares, a atenção geral está cada vez mais voltada para sua utilização industrial (10). Inúmeros estudos têm sido feitos no sentido de reciclar estes materiais, para que ao invés de representarem um ônus e uma ameaça, possam ser utilizados como bens econômicos capazes de aumentar receitas públicas, proporcionar maiores oportunidades de emprego, minimizar a poluição, e melhorar a qualidade de vida.

Entre os resíduos industriais, chamou-nos particularmente a atenção, um dos resíduos da indústria de cervejaria: o TRUB.

O TRUB foi largamente utilizado por pequenos produtores de leite de nossa região como complemento alimentar animal devido seu alto teor protéico; no entanto, com o crescimento da cidade, as zonas produtoras distanciaram-se cada vez mais e tornou-se anti-econômico o transporte do produto, que passou a ser um resíduo difícil de ser disposto. Segundo Mohlman (47), o resíduo de um barril de cerveja, tomando por base sua Demanda Biológica de Oxigênio, equivale a uma população de dezenove

peças; para produzi-lo são liberados 772,12g de sólidos em suspensão e 1211 litros de resíduos por dia. Assim este resíduo é responsável por uma parte apreciável da carga de poluentes de uma cidade e merece atenção especial no tocante a um possível aproveitamento.

O trub é uma massa amorfa na qual predominam proteínas coaguladas, que se forma, parte na fase de decocção e parte na fase de filtração do mosto através do lúpulo. Durante o processo há a formação de dois tipos de trub, que são:

- o TRUB QUENTE, que se forma pela coagulação das substâncias nitrogenadas e pela presença de polifenóis;
- o TRUB FRIO, que se forma no processo de clarificação, quando o mosto é resfriado.

Atualmente, o trub pode ser retirado como sedimento, dentro do tanque de mosto quente, por centrifugação ou ainda por filtração. A quantidade de trub obtida varia, de acordo com diversos fatores como:

- 1) O conteúdo protéico do malte.
- 2) A técnica de maceração.
- 3) O tempo e a temperatura utilizados no cozimento do mosto.

Seu conteúdo, em matéria seca, é de:

- . 50 - 60% proteínas
- . 16 - 20% resinas de lúpulo
- . 20 - 30% polifenóis
- . 02 - 03% cinzas.

O trub não é o único resíduo da Indústria de Cervejaria; sem considerarmos o processo de malteação, temos vários outros resíduos como:

- cevada esgotada
- restos de lúpulo
- levedura decantada ou centrifugada
- águas de lavagens
- papéis, vidros, etc...

Cada um destes resíduos já possui um grande número de utilizações possíveis, por exemplo: os grãos esgotados de cevada são utilizados como complemento alimentar animal (6, 8, 25, 31, 43, 65) e na produção de biogás (11). Os restos de lúpulo são utilizados como fertilizantes (30, 33, 68), como complemento de rações animais (22) e como combustível para a geração de calor na própria cervejaria (48). A levedura, o mais valioso subproduto da cervejaria, tem grande utilização como alimento humano (8) e animal (8), como fonte de vitaminas (8), substrato para a produção de proteína unicelular (9, 42, 56, 63), na indústria Farmacêutica (41) ou ainda reutilização na própria cervejaria (41).

Quanto ao trub, pouco foi encontrado sobre sua utilização. Lewis (40) relata sua utilização na própria cervejaria, fornecendo sítios que promovem inter-reações adicionais de proteínas e polifenóis, permitindo assim maior estabilidade ao resfriamento e à fragrância da cerveja.

O melaço, mel, licor-mãe, é o subproduto da Indústria Açucareira. É obtido após a cristalização e a centrifugação da sacarose, do caldo-de-cana ou, em determinados países, da beterraba. O processo de cristalização é repetido pelo menos por três vezes ou até que o açúcar invertido, os componentes não açucarados e a alta viscosidade não permitam maior cristalização.

O melaço é portanto um líquido viscoso, escuro, contendo sacarose, açúcares invertidos, sais e demais compostos não açucarados.

Segundo Almeida (1), a composição do melaço residual é a seguinte:

	<u>MÍNIMA</u>	<u>MÁXIMA</u>	<u>MÉDIA</u>
Brix	73,35	91,60	83,20%
Bé	44,70	48,70	42,80%
Peso Específico	1,41	1,49	1,43%
Pol	10,68	41,85	28,12%
Sacarose (Clerget)	15,79	46,90	32,25%
Açúcares Redutores	9,66	39,40	20,98%
Açúcares Totais Ferment.	47,70	58,70	52,20%
Pureza Aparente	30,00	63,90	42,45%
Cinzas	4,58	9,40	8,20%
Proteínas	2,80	12,00	8,20%

Nas cinzas, a composição dos principais elementos é a seguinte:

	<u>MÍNIMA</u>	<u>MÁXIMA</u>	<u>MÉDIA</u>
Sílica (SiO <sub>2</sub> )	0,40	1,55	0,80%
Potássio (K <sub>2</sub> O)	3,00	7,00	5,00%
Cálcio (CaO)	0,90	1,50	0,30%
Magnésio (MgO)	0,40	0,70	0,10%
Fósforo (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	0,30	0,50	0,15%
Sódio (Na <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )	0,20	0,50	0,15%
Ferro (Fe <sub>2</sub> O <sub>5</sub> )	0,20	1,00	0,40%
Sulfatos (SO <sub>3</sub> )	2,00	3,00	2,15%
Cloretos (Cl)	0,10	0,90	0,45%

Segundo Olbrich (54) encontra-se ainda no melaço, tra-

ços dos seguintes ácidos: Oxálico, Lático, Oxiglutárico, Sacarínico, Húmico, Aconítico e Arábico.

O Brasil é atualmente um dos maiores exportadores de melão residual, no entanto, com a criação do PROALCOOL, grande parte deste melão passou a ser utilizado para a produção de álcool, diminuindo sensivelmente a quantidade exportada (7). A maior utilização do melão é na produção de álcool: uma tonelada de melão, após o tratamento adequado, pode gerar entre 270-280g de etanol absoluto (7). O melão é ainda utilizado na produção de ácidos orgânicos como: ácido cítrico, lático, itacônico, butírico, acético, fumárico e glucônico (54). É matéria-prima para a obtenção de solventes orgânicos como: acetona, butanol, dioxiacetona, etc. (61). Pode ser empregado na produção de antibióticos, enzimas, vitamina B e glutamato monossódico (61). É um substrato bastante utilizado na produção de células como *Candida* sp, *Saccharomyces* e na produção de cogumelos (61). O melão é também utilizado na produção de bebidas fermentadas com rum, arak, etc. (61).

## 2 OBJETIVOS

Tendo em vista o grande interesse que apresenta o ácido glucônico na Indústria em geral, tanto que a Central de Medicamentos destaca este produto em sua Relação Nacional de Substâncias para Medicamentos, nossa atenção foi voltada para a produção do mesmo.

Levando-se em conta as condições potenciais do TRUB como matéria-prima, pensou-se em utilizar o mesmo na produção do ácido glucônico, utilizando-se o processo mais econômico possível, ou seja, o processo fermentativo. Procurou-se orientar o trabalho no sentido de obter o produto desejado utilizando-se o processo mais econômico, o mínimo de nutrientes sintéticos e equipamentos menos sofisticados possíveis; para tanto, optou-se por crescimento estacionário.

Houve uma preocupação fundamental em se determinar a composição química e as características físico-químicas do trub, uma vez que as mesmas não foram encontradas integralmente na literatura.

Procurou-se as condições ideais na preparação dos mostos (extrato de trub), no sentido de se aproveitar ao máximo os nutrientes presentes nos mesmos.

O objetivo do presente trabalho é averiguar as possibilidades potenciais do trub como matéria-prima para a produção de ácido glucônico, ou como nutriente no processo de fermentação do melão na produção do ácido glucônico.



### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS

##### 3.1.1 Trub

O trub utilizado foi cedido pela Companhia Cervejaria Brahma de Curitiba, Paraná. As amostras recebidas, representando produções diferentes, eram misturadas a fim de proporcionar homogeneidade ao material a ser utilizado. As amostras eram então embaladas em sacos plásticos em unidades de 1,0kg, removia-se o ar do mesmo e a seguir, estocava-se em *freezer* a -15°C até o momento de uso. Quando da utilização o material era descongelado sob água corrente.

##### 3.1.2 Melaço

O melaço foi cedido pela Destilaria de Álcool Correia Arruda - DACALDA, de Jacarezinho, Paraná. Estocado em galões plásticos, foi guardado em *freezer* a -15°C (açúcar total: 75,24%: 15,20% açúcar redutor e 60,05% açúcar não redutor).

##### 3.1.3 Microorganismo

O microorganismo utilizado, fornecido pela Disciplina de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações, UFPR, foi uma cepa de *Aspergillus niger* NRRL-3, obtida do Northern Regional Research Laboratory - Peoria - Illinois, USA.

#### 3.1.4 Enzimas

A celulase foi cedida pela Biobrãs - Bioquímica do Brasil S/A - Montes Claros, Minas Gerais. Lote Nr. C-108/195, de 23 de junho de 1982.

#### 3.1.5 Reagentes

Os reagentes utilizados durante o trabalho eram de marcas diversas, particularmente Merck, Carlo Erba, J. T. Baker e Mallinckrodt, todos considerados quimicamente puros.

#### 3.1.6 Aparelhos e materiais

- a) Potenciômetros Methrom e Micronal
- b) agitador Jouan
- c) autoclaves Fabbe e Fanen
- d) balança analítica Sartorius
- e) estufas Fabbe e Fanen
- f) espectrofotômetros Jena e Coleman Júnior
- g) concentrador à vácuo Quimis
- h) mufla IPL
- i) microscópio Olympus
- j) lupa Jena
- l) digestor e destilador micro Kjeldahl
- m) fogareiros Ful-kontrol
- n) fluxo laminar Trox
- o) freezer Prosdócimo
- p) geladeira Prosdócimo
- q) cubas para cromatografia
- r) resinas trocadoras de íons Dowex e Merck.

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Determinação da composição do TRUB

#### 3.2.1.1 Determinações físico-químicas

3.2.1.1.1 Determinação do pH - Para a determinação do pH, utilizou-se cinco amostras diferentes. Cada amostra foi subdividida em três grupos e determinou-se o pH:

- a) logo após o preparo da suspensão aquosa (1:1);
- b) após 45 minutos de maceração;
- c) após 20 minutos de autoclavação a 121°C a 1 atmosfera.

3.2.1.1.2 Umidade - Para a determinação da umidade do trub, utilizou-se cinco amostras em duplicata, provenientes de partidas diversas, e o método utilizado foi aquele descrito pela AOAC (36).

3.2.1.1.3 Cinzas - Foi utilizada a técnica preconizada pela AOAC (36), método 14006. Utilizou-se cinco amostras em triplicata.

### 3.2.2 Determinação quantitativa dos componentes do TRUB

3.2.2.1 Nitrogênio total - O nitrogênio foi determinado pelo método de Kjeldahl (36). Seis amostras foram dessecadas em estufas a 105°C por três horas e após a homogeneização em um gral, procedeu-se à digestão, posteriormente à destilação e à determinação do nitrogênio. Todas as amostras foram determinadas em triplicata. O nitrogênio total do extrato aquoso do trub também foi determinado de acordo com o método descrito.

3.2.2.2 Componente mineral - Para determinação dos componentes minerais como Fósforo, Potássio, Magnésio e Cálcio, foram utilizadas técnicas de AOAC (36), métodos 25084, 25085, 25086 e 25087, respectivamente. As determinações foram feitas a partir do macerado e em triplicata, e em trub "*in natura*".

3.2.2.3 Determinação quantitativa de açúcares - Testou-se diferentes métodos para a determinação dos açúcares nos extratos aquosos de trub, usando sempre as mesmas amostras para todos os métodos. O extrato aquoso foi desproteínizado utilizando-se o Sulfato de Zinco e Hidróxido de Bário (70) e/ou Ácido Tricloroacético (70). Os métodos utilizados foram:

- a) Método de Fehling - técnica descrita por Terra (67).
- b) Método de Eynon-Lane, descrita no Diário Oficial (17).
- c) Método de Fenol Sulfúrico, segundo Dubois et al. (23).
- d) Método de Somogyi-Nelson (70).
- e) Método do Ácido Dinitrossalicílico, segundo Summer (66).

3.2.2.4 Detecção de açúcares no extrato aquoso do TRUB - No extrato aquoso, obtido e desproteínizado conforme já descrito, no item 3.2.2.3, e tratado alternadamente com resinas catiônicas e aniônicas, foram identificados alguns açúcares utilizando-se a cromatografia em camada delgada e em papel whatman nº1.

As condições utilizadas foram as seguintes:

- a) fase estacionária - sílica gel C, tamponada com solução aquosa de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  0,5M (1:2), ativada por uma hora a 110°C;
- b) fase móvel - isopropanol : Piridina : Água (3:1:1);
- c) desenvolvimento - 10 cm;

- d) câmara - retangular saturada;
- e) padrões - sacarose, glucose, maltose, xilose, todos dissolvidos em solução de piridina 1%;
- f) visualizador:-  $\alpha$ -naftol-ácido sulfúrico segundo Stahl (64).

### 3.3 HIDRÓLISE DE CARBOHIDRATOS DO TRUB

#### 3.3.1 Hidrólise ácida

A hidrólise ácida baseou-se no método descrito por Selvendran (62). Os autores recomendam a utilização de 2,0 ml de  $H_2SO_4$  2N para cada 5 mg de amostra. Cinco amostras em triplicata de trub seco foram submetidas à hidrólise ácida por 60, 120, 180, 240 e 300 minutos. Após estes tempos, neutralizava-se o ácido com NaOH 1N e determinava-se a quantidade de ART pelo método de DNS.

#### 3.3.2 Hidrólise enzimática

A hidrólise enzimática foi realizada com trub seco (o trub foi levado à estufa (60-70°C) durante 72 horas, ou até peso constante, e triturado até se obter um pó uniforme).

As proporções testadas variavam de 2 a 1000 mg de trub para 1 mg de enzima e os tempos variavam de 0 a 240 minutos. O sistema de incubação continha: 5,0 mg de trub seco, tampão citrato 50 mM pH 4,8, celulase (Biobrás), 54 UBfm e incubadas a 50°C sob agitação por tempos estabelecidos. A reação foi interrompida pela adição de DNS e os açúcares determinados.

### 3.4 ESTABILIDADE NA CONSERVAÇÃO DO TRUB

O trub para este trabalho, foi conservado em freezer até

sua utilização, entretanto o emprego de grandes volumes do mesmo acarretou problemas de armazenamento. Este experimento teve por finalidade, determinar a viabilidade de se conservar o trub fora de refrigeração. Amostras contendo cerca de 1,0kg foram colocadas em recipientes abertos de grande superfície e deixados à temperatura ambiente. Coletou-se amostras diárias e determinou-se o ART pelo DNS. Procedeu-se de modo análogo com amostras conservadas em *freezer* e em refrigerador (4°C).

### 3.5 EXTRAÇÃO AQUOSA

#### 3.5.1 Extração aquosa de nutrientes do TRUB

Para a extração dos nutrientes escolheu-se o processo de maceração com água de torneira (pH 7,2). Colocava-se o trub em água fria, permitindo a solubilização dos elementos nutritivos e a seguir procedia-se uma filtração por tecido (pano de algodão), e posteriormente, pelo papel de filtro (Mellita).

#### 3.5.2 Determinação da proporção TRUB:água

Determinou-se, inicialmente, a proporção ideal de trub e água, baseando-se na liberação de ART pelo método DNS. Para tanto, variou-se as proporções de trub e água em um tempo fixo. As proporções testadas foram as seguintes:

- a) uma parte de água para uma de trub;
- b) uma parte de trub para duas de água;
- c) uma parte de trub para cinco de água.

#### 3.5.3 Determinação do tempo de maceração

Utilizando-se a proporção já estabelecida de trub:água determinou-se o tempo ideal de maceração, utilizando-se para

isto, cinco amostras diferentes, em duplicatas. Os tempos utilizados foram: 15, 30, 45, 60, 960 e 1440 minutos. Após os tempos determinados, media-se a quantidade de açúcares redutores liberados pelo método de DNS.

#### 3.5.4 Efeito da temperatura na extração aquosa do TRUB

Com a finalidade de se verificar a possibilidade de ocorrer uma diferença significativa na extração de açúcares, por maceração e extração por aquecimento simples e por pressão, foi realizada uma comparação entre estes métodos, utilizando 5 grupos de amostras diferentes de TRUB, que foram preparadas, utilizando-se o tempo de maceração e a proporção do trub/água já padronizados.

As amostras foram submetidas à maceração com água:

- a) a temperatura ambiente (17°C em média), por 45 minutos;
- b) por aquecimento até ebulição, por 45 minutos;
- c) autoclavadas por 30 minutos a 121°C a 1 atmosfera; após o tempo determinado, as amostras eram filtradas e determinava-se o ART pelo método DNS.

#### 3.6 MANUTENÇÃO DO MICROORGANISMO

O microorganismo foi mantido em um meio sólido preparado com o macerado de trub acrescido de 3% de agar. Esterilizou-se o meio por autoclavação a 110°C, por trinta minutos. Após a inoculação os tubos eram mantidos a 20°C por cinco a oito dias, até obter-se abundante esporulação. Os cultivos já desenvolvidos eram guardados em *freezer* até o momento de sua utilização.

### 3.7 PADRONIZAÇÃO DO INÓCULO

Os esporos eram coletados dos tubos com o auxílio da adição de uma solução de TWEEN 80 a 0,05%. Após coletados, os esporos eram contados em câmara de Neubauer ou determinados pelo método espectrofotométrico segundo Moyer e Stork (51).

Na determinação de comprimento de onda de absorção máxima, foi preparada uma suspensão de esporos e a absorbância determinada em diferentes comprimentos de onda (380 - 700 nm). Preparou-se a seguir uma curva de calibração. De uma suspensão contendo número conhecido de esporos (média de  $6,5 \times 10^8$  esporos/ml) preparou-se uma série de dez tubos com diluições crescentes de esporos. Determinou-se a D.O. de cada tubo e a seguir, utilizando-se a câmara de Neubauer, o número de esporos.

Uma vez padronizado o número de esporos, estes eram transferidos para garrafas de Roux contendo 200 ml de macerado de trub esterilizado a 110°C por trinta minutos. As garrafas semeadas eram levadas à estufa (30°C) por 5 a 8 dias para permitir a germinação. Como controle utilizou-se o meio recomendado por Moyer para germinação (49). Este meio era utilizado como inóculo para a fermentação.

### 3.8 PREPARO DOS MEIOS PARA FERMENTAÇÃO

#### 3.8.1 Meio de Moyer

O meio recomendado por Moyer (49) contendo: 125g de glucose, 0,156g de  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ ; 0,188g de  $KH_2PO_4$ ; 0,388g de  $(NH_4)HPO_4$  e 26,0g de  $CaCO_3$  para 1 litro de água. Este meio foi utilizado como controle.



### 3.8.2 Meio de Moyer substituído

Utilizou-se o meio tal como no item 3.8.1, porém substituindo-se a glucose por melaço como fonte de carbono (concentração de açúcar entre 10 - 15%).

### 3.8.3 Meio de TRUB

O meio de trub foi preparado utilizando-se o macerado obtido segundo as especificações anteriores; o meio foi esterilizado por 30 minutos a 110°C.

### 3.8.4 Meio de TRUB acrescido de $\text{CaCO}_3$

Ao meio de trub foi adicionado 26g/l de  $\text{CaCO}_3$ . A quantidade adicionada foi calculada em função da quantidade de ART de cada meio. Adicionava-se uma quantidade capaz de neutralizar 94% do ácido formado. Para estes cálculos tomou-se por base as quantidades utilizadas por Moyer (49). O meio e o  $\text{CaCO}_3$  eram esterilizados separadamente e misturados no momento de utilização.

### 3.8.5 Meio de TRUB contendo melaço

Utilizou-se o meio de trub com adição de melaço como fonte de açúcares. Diluiu-se o melaço no macerado de trub de modo que a concentração final de açúcares ficasse entre 10 e 15%. Após a autoclavação adicionava-se o  $\text{CaCO}_3$ , calculado para neutralizar 94% do ácido teoricamente formado.

### 3.8.6 Meio de melaço

Diluiu-se o melaço com água até que a concentração de açúcares ficasse entre 10 e 15%. Adicionou-se  $\text{CaCO}_3$  após a

esterilização, calculado como para os meios já citados.

### 3.9 FERMENTAÇÃO

Para a fermentação utilizou-se garrafas de Povitzky, que fornecem uma grande área superficial. A relação superfície/volume utilizada foi de 1,125. O crescimento foi realizado sem agitação e sem aeração artificial. Transferiu-se o micélio pré-germinado da garrafa de Roux para a de Povitzky contendo 900 ml do mosto esterilizado (45).

Vedava-se as garrafas com uma camada de algodão recoberta com gaze, que permitia fácil aeração e impedia a contaminação. A garrafa foi mantida na estufa a 30°C por todo o tempo do processo. A evolução da fermentação foi seguida através de determinações diárias do ART (66), da variação da acidez (17) e do pH.

#### 3.9.1 Coleta do material

Durante e após o término da fermentação, retirava-se o líquido por sifonação e filtrava-se o mesmo, primeiro por tecido para reter as impurezas e micélios e posteriormente através de papel. Nas fermentações onde não tivesse sido utilizado o  $\text{CaCO}_3$ , precipitava-se o ácido formado com  $\text{Ca(OH)}_2$ .

Nas fermentações onde se utilizava o  $\text{CaCO}_3$ , o líquido, após separado era filtrado por papel (Mellita). O líquido filtrado era concentrado até um terço de seu volume original.

Para se proceder à identificação, o ácido foi liberado por uma resina trocada de íons (Permutador de íons I, fortemente ácido, Merck, capacidade total de troca 4,5 eq/g) e posteriormente identificado por TLC e fenilhidrazina.

O ART era determinado pelo DNS após as amostras terem sido desproteinizadas com ácido tricloroacético (70) e neutralizadas com NaOH 1N.

A acidez era determinada, após a passagem da amostra por uma resina trocadora de íons ácida (Merck) por titulação com NaOH 0,1N utilizando-se fenolftaleína como indicador e calculados os miliequivalentes do ácido. Apenas as amostras que demonstravam através de cromatografia possuir apenas ácido glucônico eram consideradas.

O pH era verificado diretamente após a coleta da amostra, através da medida do pHmetro.

### 3.10 IDENTIFICAÇÃO DOS ÁCIDOS FORMADOS DURANTE A FERMENTAÇÃO

Após a extração, o líquido fermentado era identificado através de cromatografia em camada delgada.

O eluente nº 1 até então utilizado não resultava em uma boa separação. Quando eluídos os padrões utilizados (ácido glucônico, ácido cítrico e ácido oxálico), o ácido cítrico migrava bem, porém não havia uma separação satisfatória entre os ácidos glucônico e oxálico. Assim, testou-se uma série de outros sistemas citados em literatura, como:

- 1) n-butanol-propanona-água (4:5:1)
- 2) n-butanol-piridina-água (45:25:40)
- 3) acetona-água (85:15) (7)
- 4) álcool isoamílico-ácido fórmico-água (48,8:48,8:2,4) (7)
- 5) n-butanol-ácido acético-água (2:1:1) (7)
- 6) etanol-amoníaco-água (100:16:12)
- 7) metanol-amoníaco-água (7,5:1,5:1,0)
- 8) metanol-amoníaco concentrado (8:2)

- 9) metanol-amoníaco concentrado (7:3)
- 10) acetato de etila-ácido fórmico-água (6:2)
- 11) n-butanol-ácido fórmico-água (6:1:2)
- 12) isobutanol-ácido fórmico-água (8:1:1) (5)
- 13) álcool isoamílico-clorofórmio -água (4:1:1)
- 14) butanol-água (9:1)
- 15) etanol-amônia-água (20:1:4)
- 16) n-butanol-ácido fórmico-água (8:1:1)
- 17) n-butanol-ácido fórmico-água (6:2:2)
- 18) isobutanol-ácido fórmico-água (6:2:2)
- 19) isobutanol-ácido fórmico-água (6:1:2)
- 20) isobutanol-ácido fórmico-água (8:1:0,5)
- 21) isobutanol-ácido fórmico (8:1)
- 22) isobutanol-ácido fórmico (8:1) sat. em água
- 23) isobutanol-ácido fórmico (5:1)
- 24) metiletilcetona-diclorometano-ácido fórmico (3:5:1).

Com o eluente nº 1 preparou-se uma série de placas que foram reveladas com:

- 1) visualização pelos raios U.V.
- 2) solução de metavanadato de amônia (3)
- 3) verde de bromocresol (5)
- 4) reativo de Barfoed (3)
- 5) reativo de Wayne (3)
- 6) reativo de Benedict (3)
- 7) reativo de Criswell (3)
- 8) reagente de Dudley (3)
- 9) reagente de Knapp (3)
- 10) reagente de Nylander (3)
- 11) para-anisidina (69)

12) periodato (69).

Todos estes sistemas foram testados sucessivamente em: sílica gel G, sílica gel H e celulose.

Nenhum deles mostrou-se eficiente isoladamente: a separação entre o ácido glucônico e o ácido oxálico era muito pequena. Imaginando-se que seria problema da espessura da sílica, testou-se diferentes proporções de sílica e água.

Testou-se os sistemas já citados, utilizando-se cada um deles com as seguintes proporções de sílica e água: 1:1; 1:2; 1:3 e 1:4.

Após a identificação por TLC, realizou-se uma cromatografia preparativa e o ácido isolado foi identificado como sendo ácido glucônico.

### 3.11 REUTILIZAÇÃO DOS MICÉLIOS DE *Aspergillus niger* EM CULTURA SEMICONTÍNUA

O líquido fermentado era retirado por sifonação e nova quantidade de macerado de trub estéril era adicionada assepticamente. A garrafa voltava à estufa e a fermentação seguida novamente. A coleta e identificação dos produtos formados durante a fermentação foram realizadas de acordo com as técnicas citadas no item 3.9.1 e 3.10.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

##### COMPOSIÇÃO DO TRUB

Durante o processo de separação do TRUB, segundo esclarecimentos prestados pelo pessoal técnico da fábrica, o teor de umidade, material sólido, etc., não é sempre o mesmo. Isto significa que em cada partida, o TRUB pode apresentar algumas diferenças quantitativas em sua composição. Isto foi evidenciado nas determinações realizadas onde a concentração de ART variava entre 3,0 e 4,8g%.

Houve uma preocupação em se obter o máximo de informações possíveis a respeito da composição do trub, assim, realizou-se uma série de experimentos utilizando-se os recursos técnicos disponíveis.

O pH do macerado, logo após a filtração, variava de 5,9 a 6,0 e após 45 minutos oscilava entre 5,6 - 5,9, enquanto que, após a autoclavação o pH decrescia a 5,45 - 5,6.

Segundo a literatura (24, 52) o teor de cinzas no trub é de 0,2 a 0,3%, no entanto, encontrou-se valores de 2,37g% no presente trabalho, o que significa um elevado teor de componentes minerais, possivelmente devido à presença de palha de arroz presente na composição do preparo do mosto.

Pesquisou-se apenas alguns dos componentes como N, P, K, Ca e Mg, devido ao fato deles serem os elementos necessários para o preparo do meio de crescimento do microorganismo e o

resultado é mostrado na tabela I, onde podemos observar o alto teor em nitrogênio. Segundo Herrick (35), o teor de N na forma de  $\text{NaNO}_3$  não deve ser superior a 0,024% devido ao declínio na produção de ácido glucônico.

A tabela abaixo mostra a composição do meio de Moyer idealizado para a obtenção de ácido glucônico comparado com a do extrato aquoso do trub e do melão. Esta composição, em alguns pontos são compatíveis mas em outros são deficientes, como no caso do açúcar e do cálcio no TRUB.

Tabela de composição de diversos meios de fermentação

	MOYER	TRUB	MELÃO	MAHMOUD
Glucose ou ART	12,5%	4,0%	10-15%	13 %
Mg	0,0156%	0,005%	0,012%	0,025%
P	0,0185%	0,074%	0,08%	0,025%
N	0,0388%	0,96%	0,08%	0,1%
Ca	2,5%	0,0006%	0,06%	0,5%

Os açúcares determinados foram somente aqueles solúveis em água, e os resultados obtidos na determinação de ART pelos diversos métodos testados, entre eles o de DNS, Somogyi-Nelson, Eynon-Lane e Fehling foram consistentes. Os métodos de DNS e Somogyi-Nelson foram os mais sensíveis, no entanto, a desproteínização com o ácido tricloroacético e posterior neutralização ocasionava interferência no método de Somogyi-Nelson, não havendo desenvolvimento de cor. Optando pelo método de DNS nas determinações de ART. A média dos valores encontrada foi de 3,9%. Quanto à dosagem dos açúcares não redutores obtida, foi

de 0,09%. O método de Fenol-Sulfúrico, apesar de mais sensível do que a técnica titulométrica de Fehling e Enyon-Lane, resultou em valores inferiores à do açúcar redutor, possivelmente, devido à presença de compostos que reduzem o cobre mesmo a frio, talvez substâncias com grupamento aldeídico ou cetônico livre (trioses e tetroses ou outros compostos), o que não ocorre na determinação pelo método de Fenol-Sulfúrico, que requer a formação de furfural ou seu derivado para que haja condensação com o fenol, o que resulta no desenvolvimento da cor final característica. É conhecida a presença de quantidades apreciáveis de polifenóis em TRUB, que pode interferir nas dosagens.

Tabela I - COMPOSIÇÃO DO TRUB "IN NATURA" E NO EXTRATO AQUOSO

		EXTRATO AQUOSO	TRUB "IN NATURA"
pH		5,75	5,96
Umidade		-	75,41%
Cinzas		-	2,37g%
Fósforo		0,074g%	0,17g%
Potássio		0,0013g%	0,02g%
Magnésio		0,0049g%	0,0098g%
Cálcio		0,0006g%	0,0120g%
Nitrogênio		0,96g%	3,91g%
Açúcares solúveis em água	Não redutores	0,09g%	-
	Redutores	3,92g%	-
	Totais	4,01g%	-



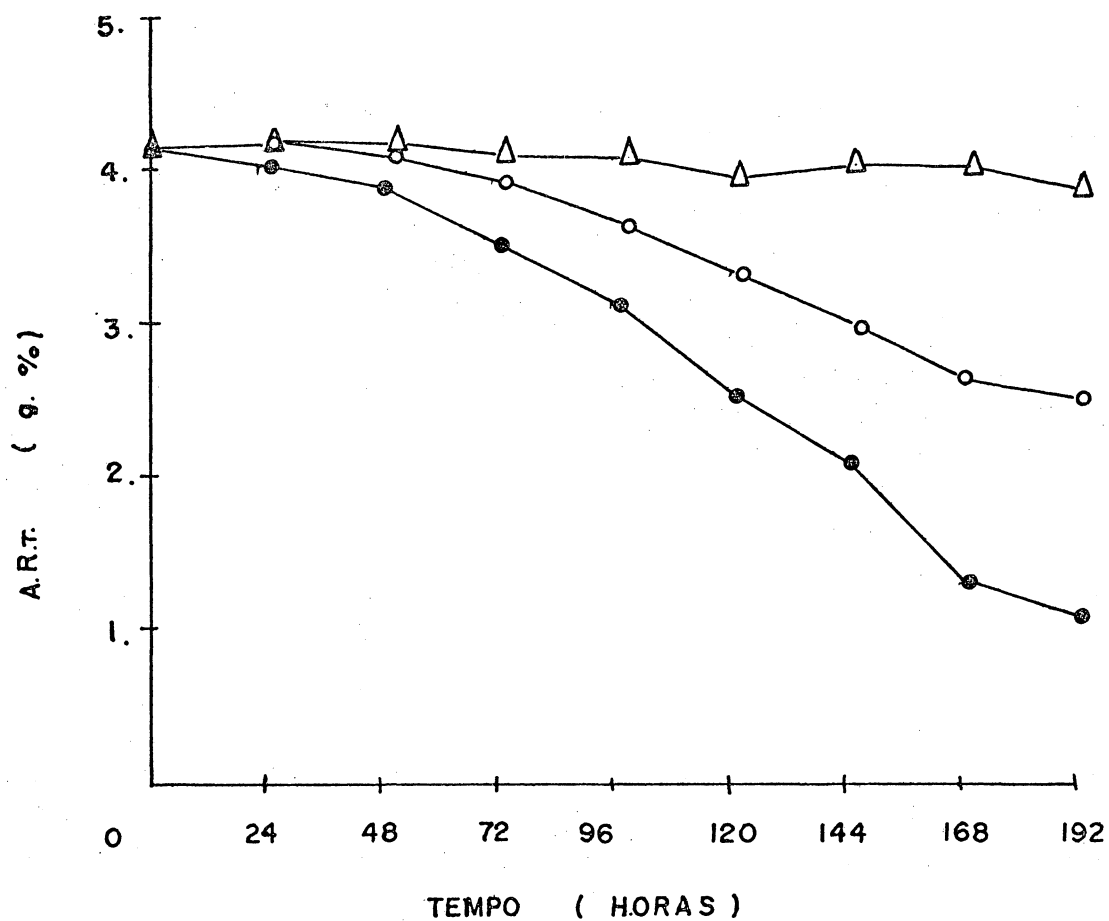


Figura 1 - ESTABILIDADE DO CONTEÚDO DE ART DURANTE A CONSERVAÇÃO DO TRUB EM DIFERENTES TEMPERATURAS

O TRUB foi conservado em congelador ( $-15^{\circ}\text{C}$ ), refrigerador ( $4^{\circ}\text{C}$ ) e à temperatura ambiente ( $17^{\circ}\text{C}$ ). O macerado foi obtido segundo Materiais e Métodos (3.5.1). O ART foi determinado pelo DNS.

Temperatura ambiente ( ● ), refrigerador ( ○ ), congelador ( Δ ).

## ESTABILIDADE DO CONTEÚDO EM ART NA ESTOCAGEM DO TRUB

Foi analisada a viabilidade de se conservar o trub em recipientes abertos e à temperatura ambiente (Fig. 1), assim como sob refrigeração e sob congelamento. Observou-se que o teor em ART decrescia com o decorrer do tempo, ficando reduzido à metade em 6 dias, enquanto que sob refrigeração o decréscimo era menos acentuado, porém progressivo, sendo assim necessário a sua manutenção a  $-15^{\circ}\text{C}$  em que era mantido o teor de ART, indefinidamente.

A diminuição no teor de ART durante a estocagem torna a manutenção dos nutrientes fundamentais, para o crescimento e produção de ácido glucônico pelo microorganismo, um processo oneroso, mas necessário no presente trabalho.

## HIDRÓLISE DE CARBOHIDRATOS DO TRUB

Segundo a literatura (52) o trub contém entre 40-70% de celulose, estando ainda presentes, grãos de malte e outros componentes. Com a finalidade de se liberar maior quantidade de açúcares redutores, experimentou-se utilizar a hidrólise ácida e enzimática. Tanto a hidrólise ácida como a enzimática do trub resultaram num aumento de 3,3 vezes no teor de ART (28g% de ART). As Figuras 2 e 3 mostram o perfil do processo hidrolítico. O pico máximo da hidrólise enzimática ocorre aos 15 minutos de incubação, enquanto que a ácida leva 3 horas.

Não se utilizou a hidrólise do trub no presente trabalho, uma vez que o processo é bastante dispendioso e observou-se que o extrato do trub poderia funcionar mais como fonte de diversos nutrientes e utilizar outra fonte de suplementação em açúcar, no presente, o melaço que é bastante disponível no nosso Estado, e de baixo custo.

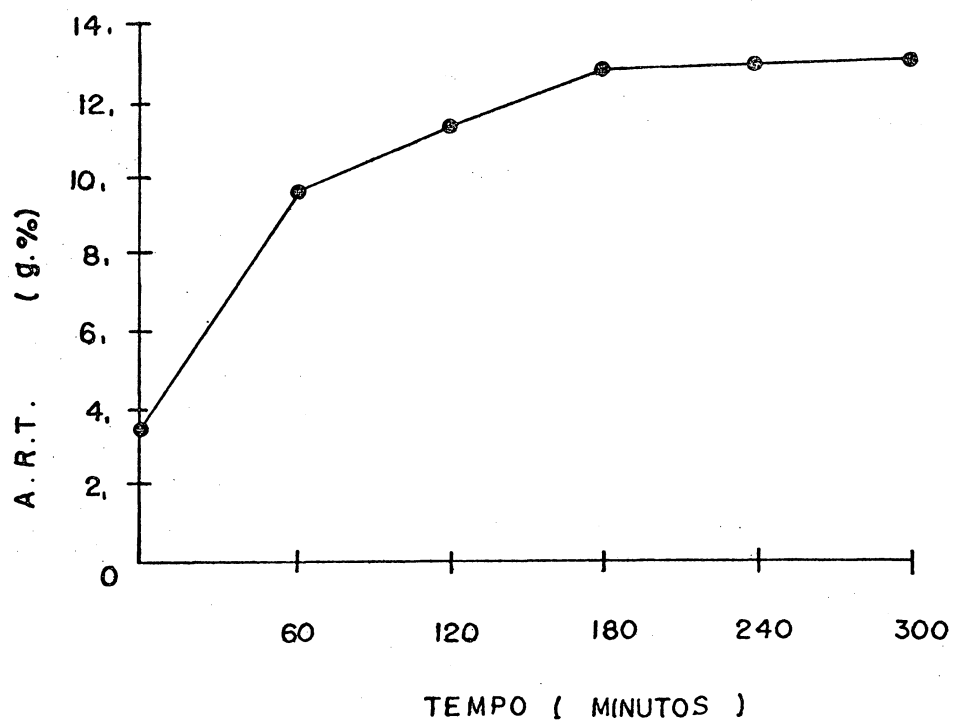


Figura 2 - CURVA DE HIDRÓLISE ÁCIDA DO TRUB SECO EM FUNÇÃO DE TEMPO

O sistema de incubação continha 5mg de trub seco em 2,0ml de  $H_2SO_4$  2N. A temperatura durante os tempos de incubação foi mantida em 120°C. Após estes períodos as amostras eram neutralizadas com NaOH 1N e os ART determinados pelo DNS.

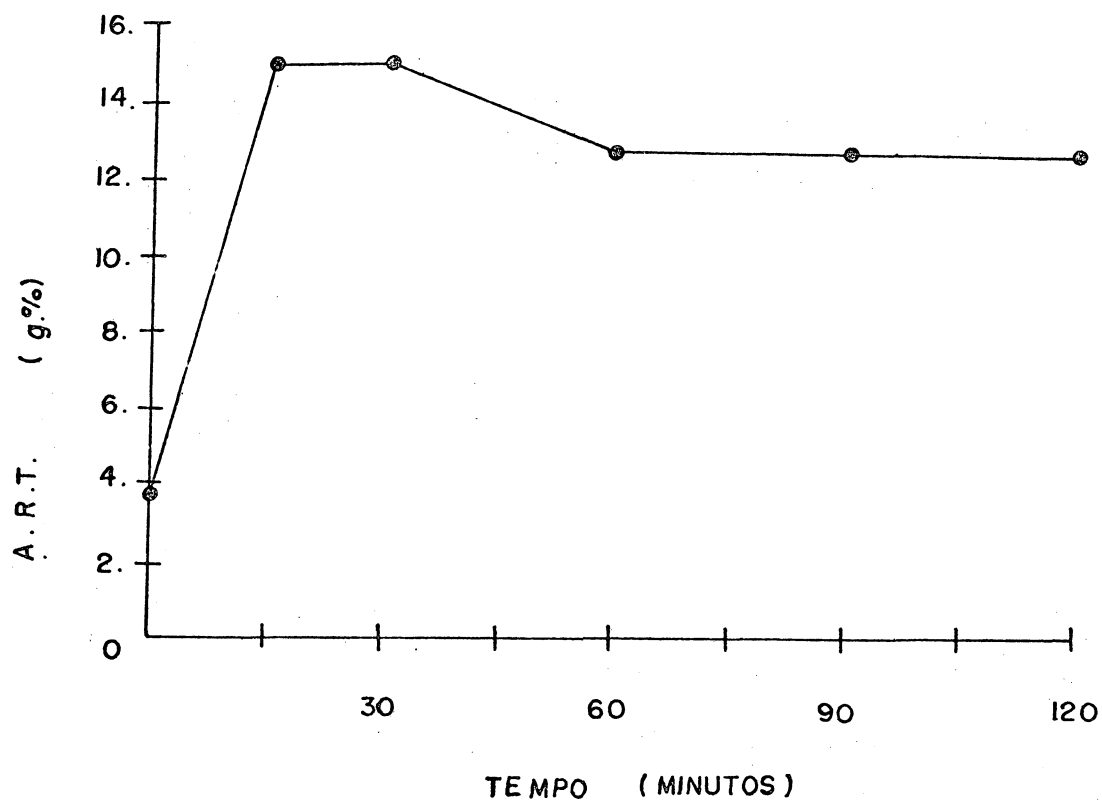


Figura 3 - CURVA DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA (CELULASE) DO TRUB SECO EM FUNÇÃO DO TEMPO

O sistema de incubação continha 5mg de TRUB e 1,0mg de celulase Biobrãs (40 Bfm) e 0,05M de tampão citrato pH 4,8. O sistema foi incubado a 50°C, com agitação de 110 rpm nos tempos estabelecidos; o ART foi determinado pelo DNS.

#### EXTRAÇÃO AQUOSA DOS NUTRIENTES DO TRUB

Para que o microorganismo utilize os elementos nutritivos durante o processo de fermentação é necessário que estes sejam solúveis em água. Uma vez que o pH da água de torneira (7,2) está bem mais próximo à neutralidade do que da água deionizada (5,3), a extração do trub foi realizada com a mesma. Os resultados comparativos quanto ao crescimento e subsequente esporulação no meio de trub do *Aspergillus niger* extraído com água de torneira e deionizada é observado na Figura 4. Não houve diferença sensível quanto ao número de esporos formados nos dois meios, bem como no teor de ART, podendo então ser possível o uso da água de torneira.

#### DETERMINAÇÃO DA PROPORÇÃO TRUB : ÁGUA

A proporção que permitiu melhor manuseio foi a de uma parte de TRUB para duas partes de água. As demais proporções resultaram muito concentradas ou diluídas.

#### DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE MACERAÇÃO

O tempo ideal de maceração do trub foi de 45 minutos (Fig. 5). Não houve aumento significativo na quantidade de ART liberada após este tempo, sendo fixado o tempo de 45 minutos nos experimentos subsequentes.

#### EFEITO DA TEMPERATURA NA EXTRAÇÃO DO TRUB

Não houve vantagens apreciáveis entre a extração por maceração e aquela por aquecimento até ebulição ou por aquecimento sob pressão, na quantidade de ART, como se pode ver a seguir:

- Extração por maceração à temperatura ambiente ..... 3,96g% - 100%
- Extração por ebulição ..... 4,05g% - 102%
- Extração por autoclavação ..... 4,64g% - 107%.

A diferença de ART extraída por autoclavação não é significativa se levarmos em conta os gastos que ela representa, em trabalho, tempo e energia.

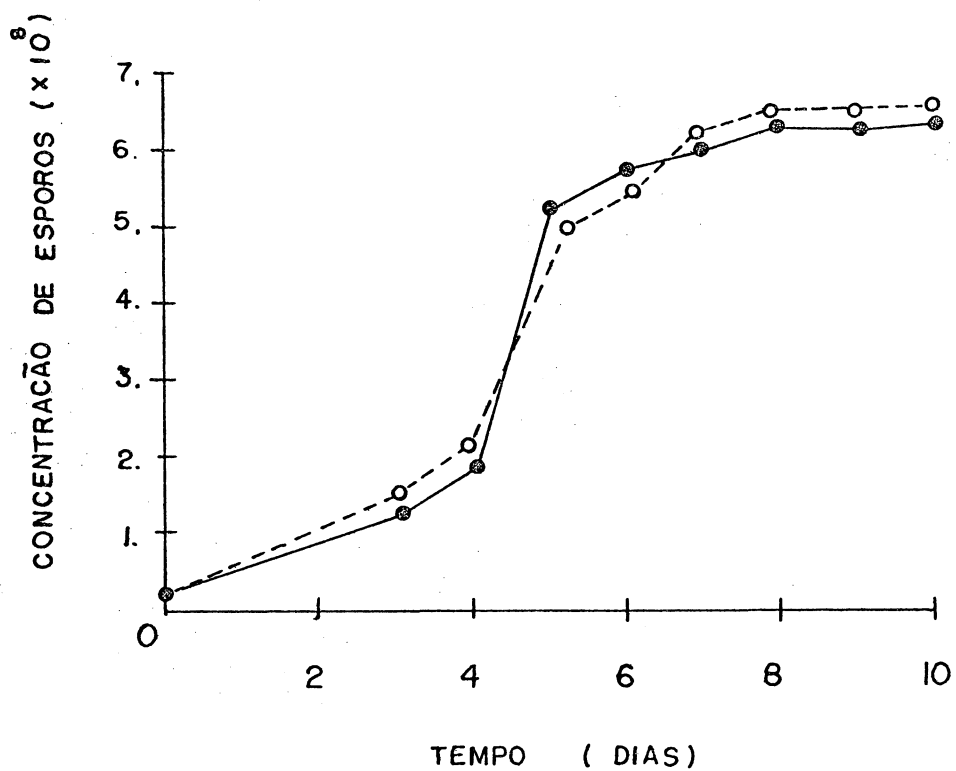


Figura 4 - ESPORULAÇÃO DO *Aspergillus niger* EM MACERADO, UTILIZANDO-SE ÁGUA DEIONIZADA E DE TORNEIRA

O microorganismo foi crescido como está descrito no item 3.6, e a produção de esporos avaliada por contagem de esporos em câmara de Neubauer.

( ○ ) água deionizada, ( ● ) água de torneira.

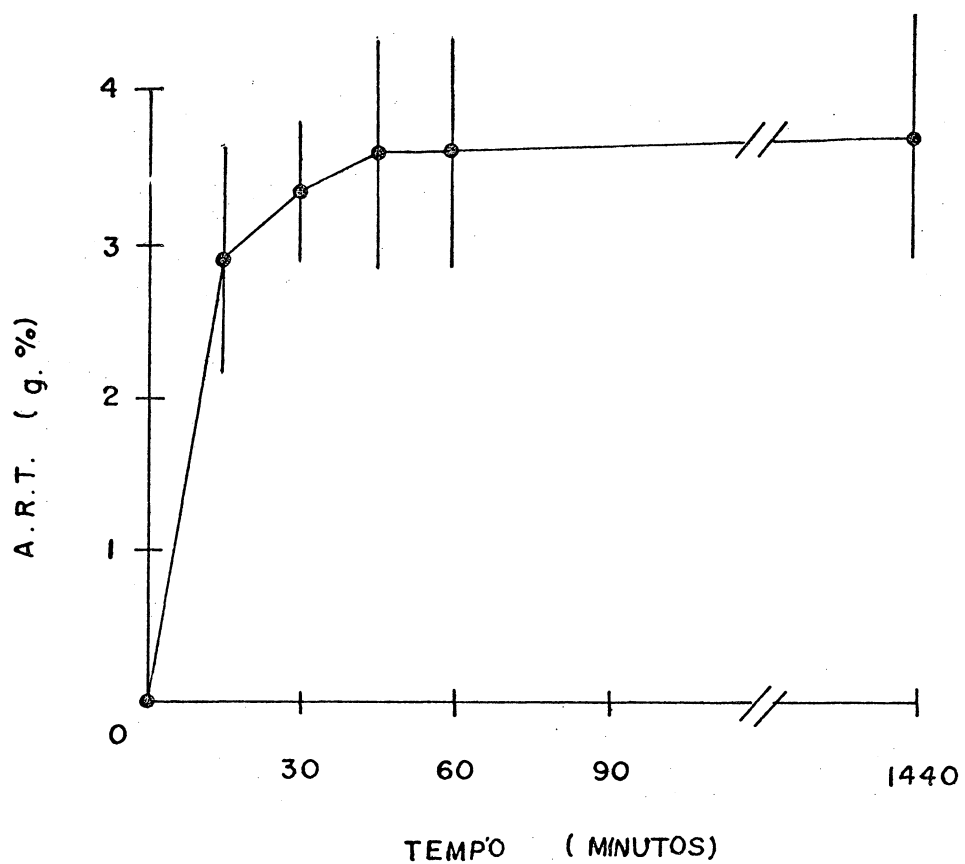


Figura 5 - DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE EXTRAÇÃO DE ART DO TRUB  
Macerado preparado com uma parte de trub para duas de água.  
ART determinado pelo método do DNS.



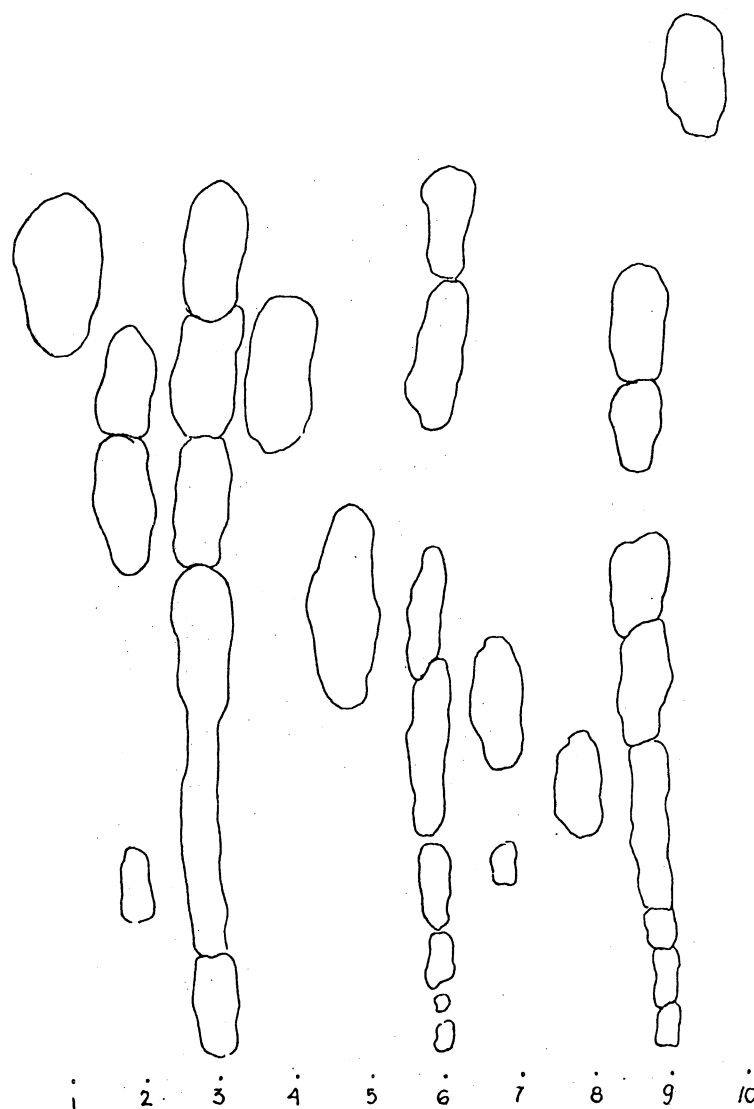


Figura 6 - DETECÇÃO DE AÇÚCARES NO EXTRATO AQUOSO DO TRUB

- |              |                                 |
|--------------|---------------------------------|
| 1) Frutose   | 6) Trub (Somogyi)               |
| 2) Galactose | 7) Maltose                      |
| 3) Melaço    | 8) Sacarose                     |
| 4) Glucose   | 9) Trub (ácido tricloroacético) |
| 5) Lactose   | 10) Xilose                      |

A cromatografia do macerado de trub, revelou a presença dos seguintes açúcares: glucose, maltose, lactose, sacarose, além de uma série de outros açúcares não identificados (Fig. 6).

No melaço, constatou-se a presença de glucose, frutose, sacarose, , galactose, maltose e outros açúcares (oligossacarídeos) não identificados. Segundo Olbrich (54), no melaço estão presentes, além da glucose, sacarose e frutose cinco oligossacarídeos, os quais são denominados de cestose, que são constituídos de duas moléculas de frutose e uma de glucose.

#### MANUTENÇÃO DO MICROORGANISMO

É desejável que o microorganismo cresça e esporule em meio tão semelhante quanto possível ao que irá fermentar. Segundo May (45), o ágar mosto favorece o crescimento e não interfere na capacidade produtora do ácido pelo microorganismo, portanto, foi utilizado um meio preparado com o próprio macerado do trub. O crescimento do fungo em meio de trub foi comparado ao crescimento do mesmo em Czapeck (27). Para que a área utilizada fosse constante, utilizou-se plaquinhas de Milipore, ao invés de tubos com ágar inclinado. Verificou-se que a esporulação do *Aspergillus niger* no meio de trub apresentou maior esporulação do que no meio de Czapeck, como pode ser observado na Tabela II.

Tabela II - COMPARAÇÃO DA ESPORULAÇÃO DO *Aspergillus niger* EM MEIO DE CZAPECK E MACERADO DE TRUB

NÚMERO DE ESPOROS x 10 <sup>6</sup>		
TEMPO	TRUB	CZAPECK
14 dias	438	303
15 dias	600	450
16 dias	740	570
22 dias	1080	650
24 dias	1287	670

Na padronização do inóculo, inicialmente, os esporos eram contados em câmara de Neubauer, porém, posteriormente, passou-se a utilizar o método espectrofotométrico baseado no trabalho de Moyer & Stork (51); no entanto, a determinação de comprimento de onda de absorção máxima obtida no presente trabalho foi de 400 nm, ligeiramente diferente dos constantes na literatura, que é de 440 nm (51). O gráfico resultante é mostrado na Figura 7.

De posse das informações relacionadas ao comprimento de onda na determinação da absorbância foi montada uma curva de calibração, onde obtivemos uma proporcionalidade no número de esporos com relação à absorbância, como pode ser observado na Figura 7.

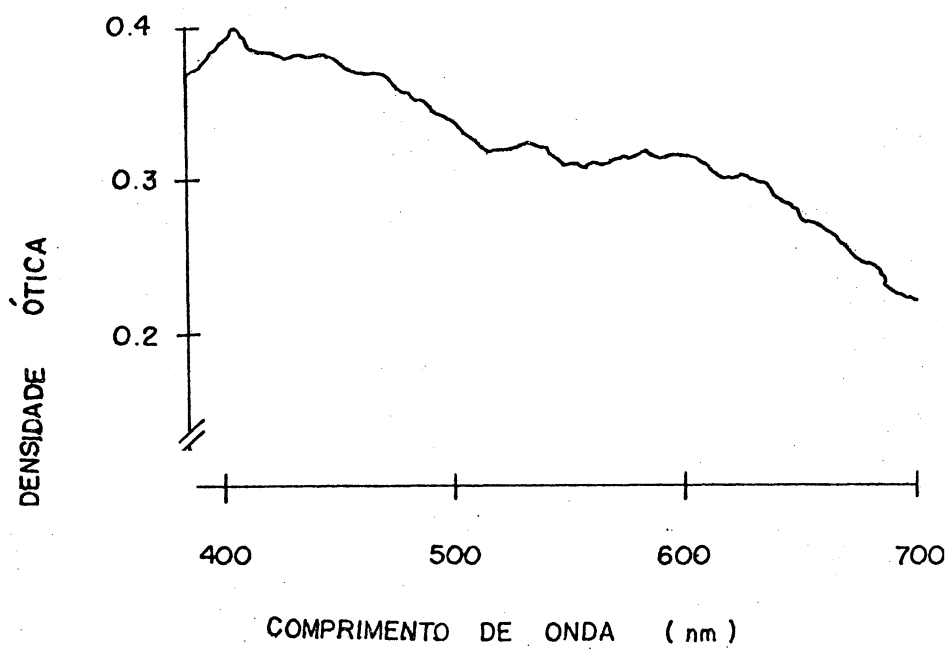


Figura 7 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO DA SUSPENSÃO DE ESPOROS DE *Aspergillus niger* EM COLORÍMETRO COLEMAN JÚNIOR  
Suspensão contendo  $9 \times 10^7$  esporos/ml.

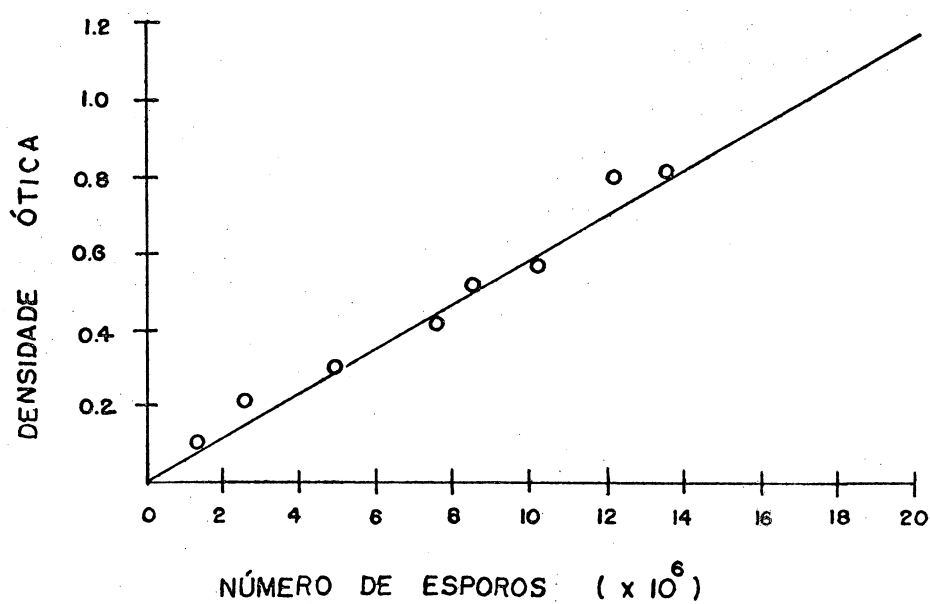


Figura 8 - CURVA DE CALIBRAÇÃO (ABSORBÂNCIA CONTRA NÚMERO DE ESPOROS)

A suspensão de esporos de *Aspergillus niger* foi feita em Tween 80 a 0,05% e os esporos contados em Câmara de Neubauer.

Leitura 400 nm.

## FERMENTAÇÃO

### *Identificação de ácidos carboxílicos*

Para se proceder a análise das fermentações foi necessário realizar a identificação dos ácidos resultantes das mesmas. Na cromatografia em camada delgada, verificou-se que as técnicas preconizadas na literatura não eram satisfatórias, sendo necessário modificações tanto no suporte como nos solventes. O suporte que permitiu melhor separação dos ácidos, foi com uma parte de sílica gel H para três partes de água.

A distinção entre o ácido cítrico e glucônico foi realizada utilizando duas placas cromatográficas, sendo cada uma delas tratada com um tipo de solvente para a eluição. O isobutanol-ácido fórmico-água (8:1:1) permitiu uma boa separação do ácido cítrico, enquanto que a etanol-amônia-água (20:1:4), permitiu melhor migração do ácido glucônico. Ambas as placas eram reveladas com verde de bromocresol, produzindo manchas de um amarelo vivo em fundo verde-azulado.

De posse dos dados de composição do TRUB e métodos de identificação de ácidos carboxílicos, foram realizados os experimentos de fermentação, utilizando o *Aspergillus niger* NRRL-3, conhecido como bom produtor de ácido glucônico.

### *Meio de Moyer*

A fermentação em meio sintético recomendado por Moyer demonstrou que a cepa de *Aspergillus niger* utilizada era uma boa produtora de ácido glucônico. Não houve nesta fermentação a formação de outros ácidos (cítrico ou oxálico) e a fermentação atingiu o máximo da produção de ácido (147 meq/l) no 11º dia; a partir daí, embora a quantidade de ART diminuísse, a pro-

dução do ácido entrou em plateau (Fig. 9).

May et al. (45) citam um rendimento de 57% em ácido glucônico quando utilizavam solução de glucose a 20% em fermentação de superfície. No presente trabalho, utilizando-se o meio recomendado por estes autores, obteve-se um rendimento de apenas 21%.

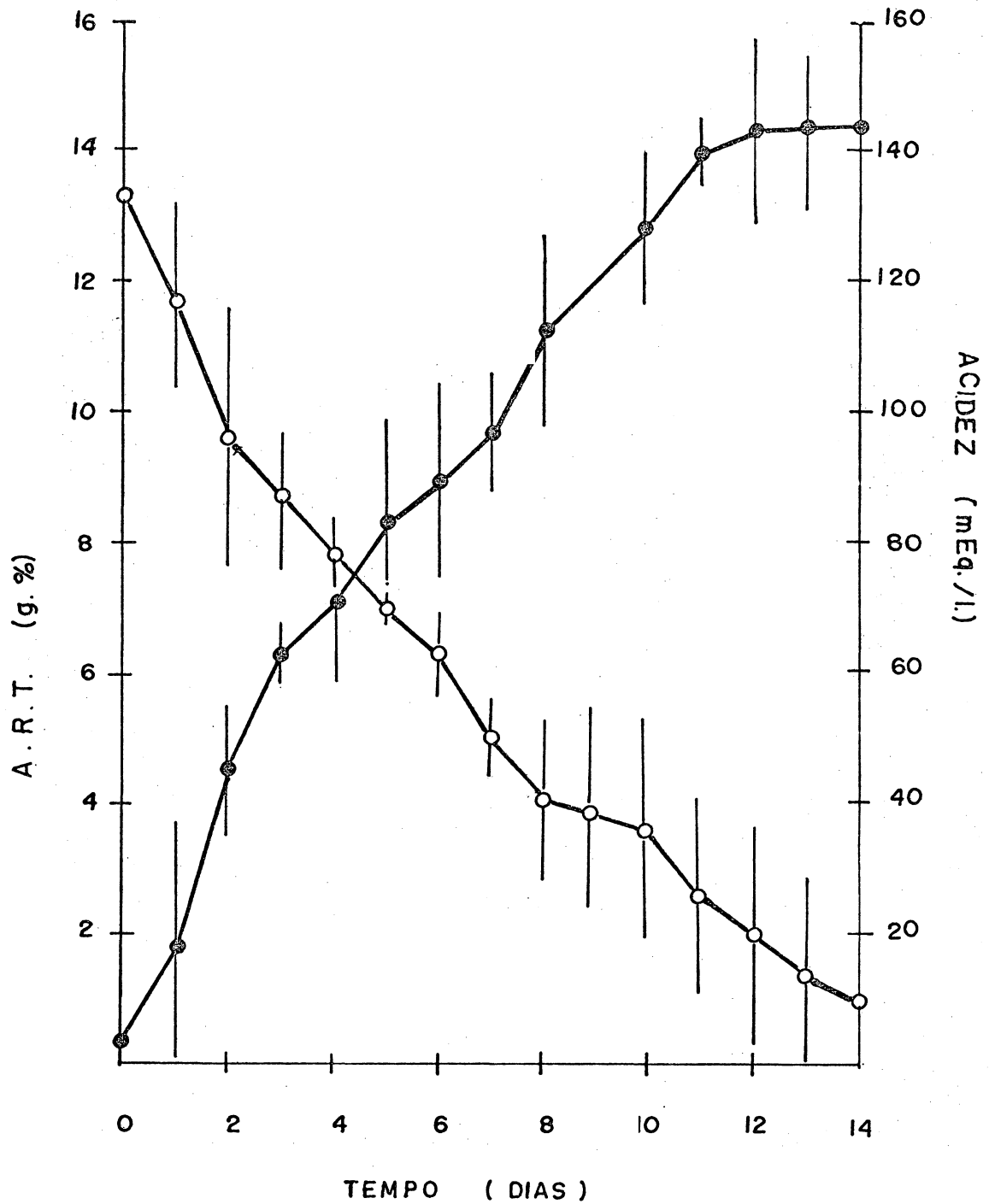


Figura 9 - FERMENTAÇÃO DA GLICOSE (12,5%) PELO *Aspergillus niger* EM MEIO DE MOYER

O consumo de ART foi determinado pelo DNS; acidez titulada pelo NaOH 0,1N.

( ● ) produção de ácido; ( ○ ) consumo de ART.



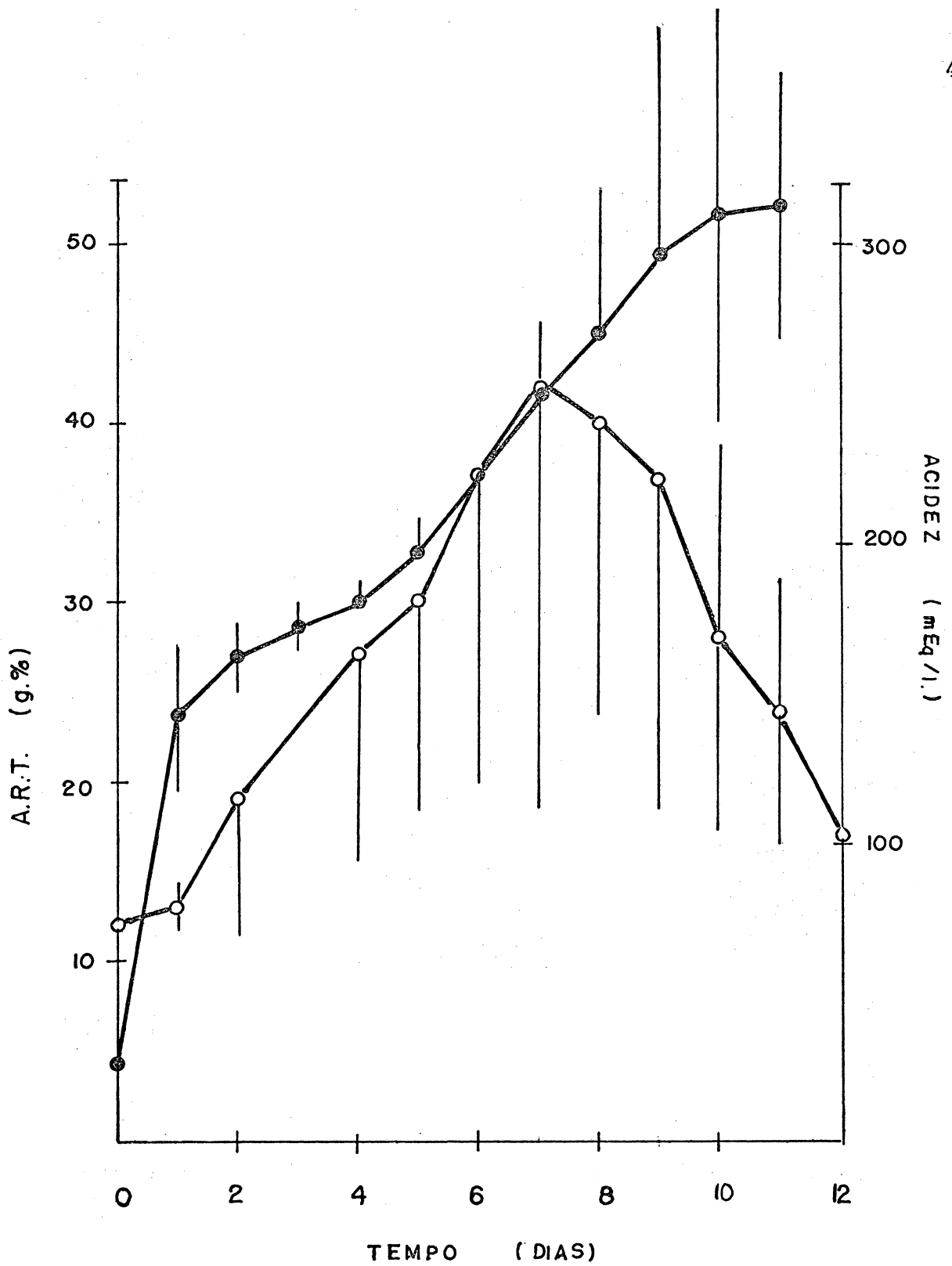


Figura 10 - FERMENTAÇÃO DOS AÇÚCARES DO MELAÇO PELO *Aspergillus niger* EM MEIO DE MOYER SUBSTITUÍDO

( ● ) produção de ácido

( ○ ) consumo de ART

*Moyer substituído*

A fim de utilizar matéria bruta barata e disponível no nosso Estado, experimentou-se utilizar o melaço como fonte de carbono no experimento seguinte, substituindo a glucose pura, e procedendo a fermentação no meio de Moyer agora com fonte de açúcar modificado. Na Figura 10, podemos observar que a produção máxima do ácido glucônico ocorreu no 10º dia, obtendo um valor de 312 mEq/l, valor este bastante superior ao do meio de Moyer suprido com glucose. O teor de açúcar redutor no início da fermentação era de 12,5% (equivalente a 694 mEq/l de glucose), e durante o processo de fermentação foi observado que os valores de ART aumentavam no decorrer do período, isto porque o açúcar predominante no melaço é a sacarose, que não é redutora, e uma vez hidrolizada para a metabolização pelo microorganismo produz o equivalente a dois moles de açúcares redutores. Podemos observar que o aumento no teor de ART ocorreu até o 7º dia de fermentação e posterior consumo dos açúcares até o 12º dia, em que ainda havia 16,78% de ART. O perfil de produção do ácido glucônico é bifásico, ocorrendo grande produção no 1º dia e reduzindo a velocidade de síntese até o 4º dia na primeira etapa da produção, e nova aceleração a partir do 5º dia, até o 10º dia.

*Fermentação em meio de TRUB*

O intuito do experimento com o macerado do trub era de utilizá-lo como matéria-prima na produção do ácido glucônico, através da fermentação dos açúcares presentes no macerado. Para tanto, o meio de fermentação consistia somente de macerado do TRUB sem nenhuma suplementação. Quando o *Aspergillus niger*

fermentou os açúcares (4,46% = 247 mEq/l) resultou na produção de 55 mEq/l de ácido glucônico, resultando em rendimento de cerca de 22% (considerando que todo AR seja glucose). Embora a produção de ácido glucônico seja baixa devido à pequena quantidade de açúcar presente, o processo fermentativo foi mais rápido e eficiente do que no meio de Moyer, pois todo o processo ocorreu em 6 dias, como pode ser observado na Figura 11.

A adição de  $\text{CaCO}_3$  no meio de TRUB que serve para a neutralização contínua do ácido recém-formado e que diminui a inativação da enzima responsável pela conversão da glucose em ácido glucônico, proporcionou um aumento mínimo de 5%, quando comparado com o meio de trub. Este resultado era esperado, uma vez que o incremento só ocorre quando a fermentação se processa com agitação e aeração vigorosa (28, 50).

Pitt et al. (55) observaram que *Penicillium notatum*, crescido em meio de CZAPECK-DOX modificado produzia gluconato e a adição de cálcio ao meio aumentava tanto a produção de ácido bem como a esporulação do fungo, sugerindo que a regulação da esporulação talvez seja influenciada pelo gluconato de cálcio.

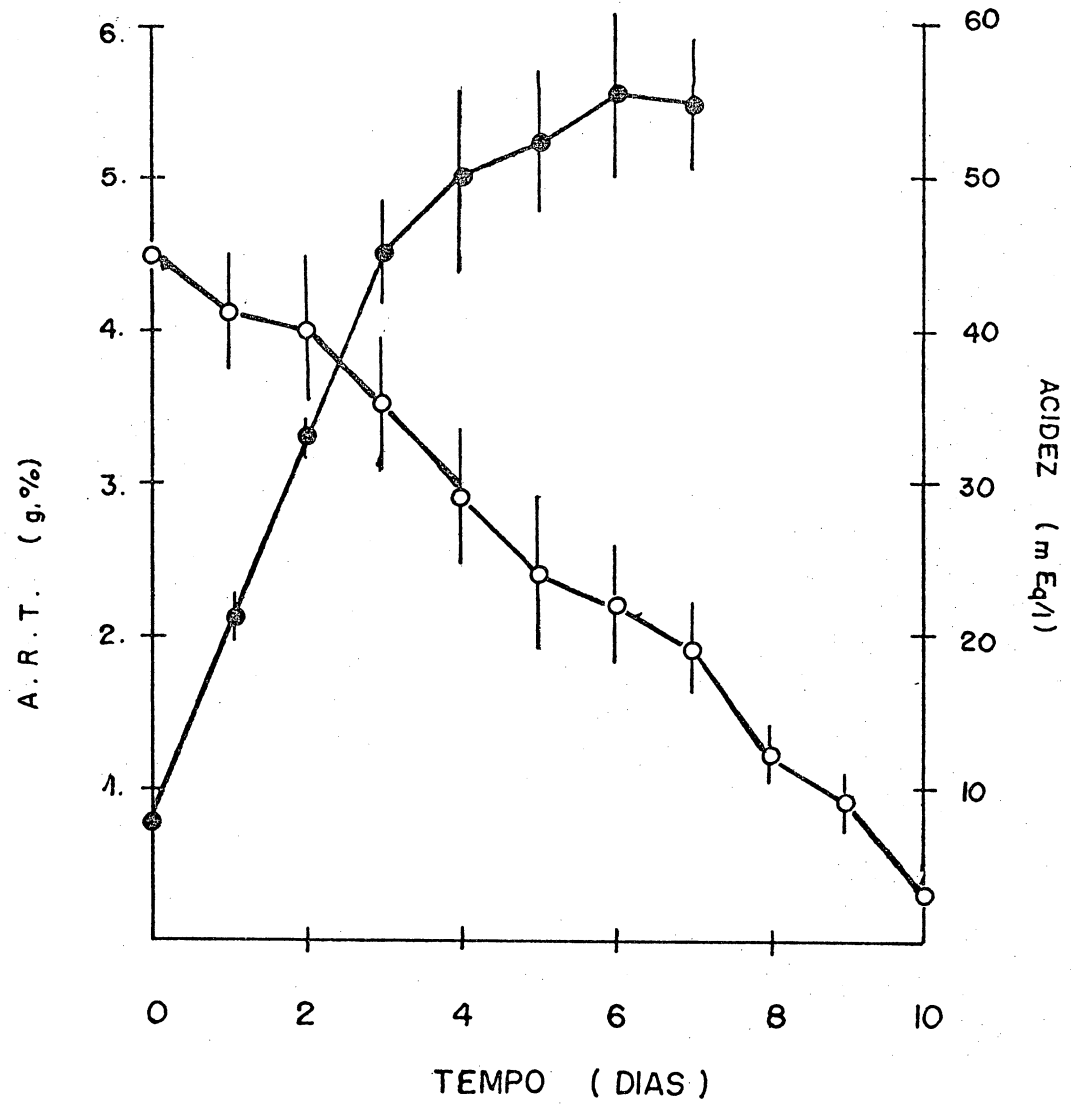


Figura 11 - FERMENTAÇÃO DOS AÇÚCARES PRESENTES NO TRUB PE-  
LO *Aspergillus niger*.

( o ) consumo de ART

( ● ) produção de ácido

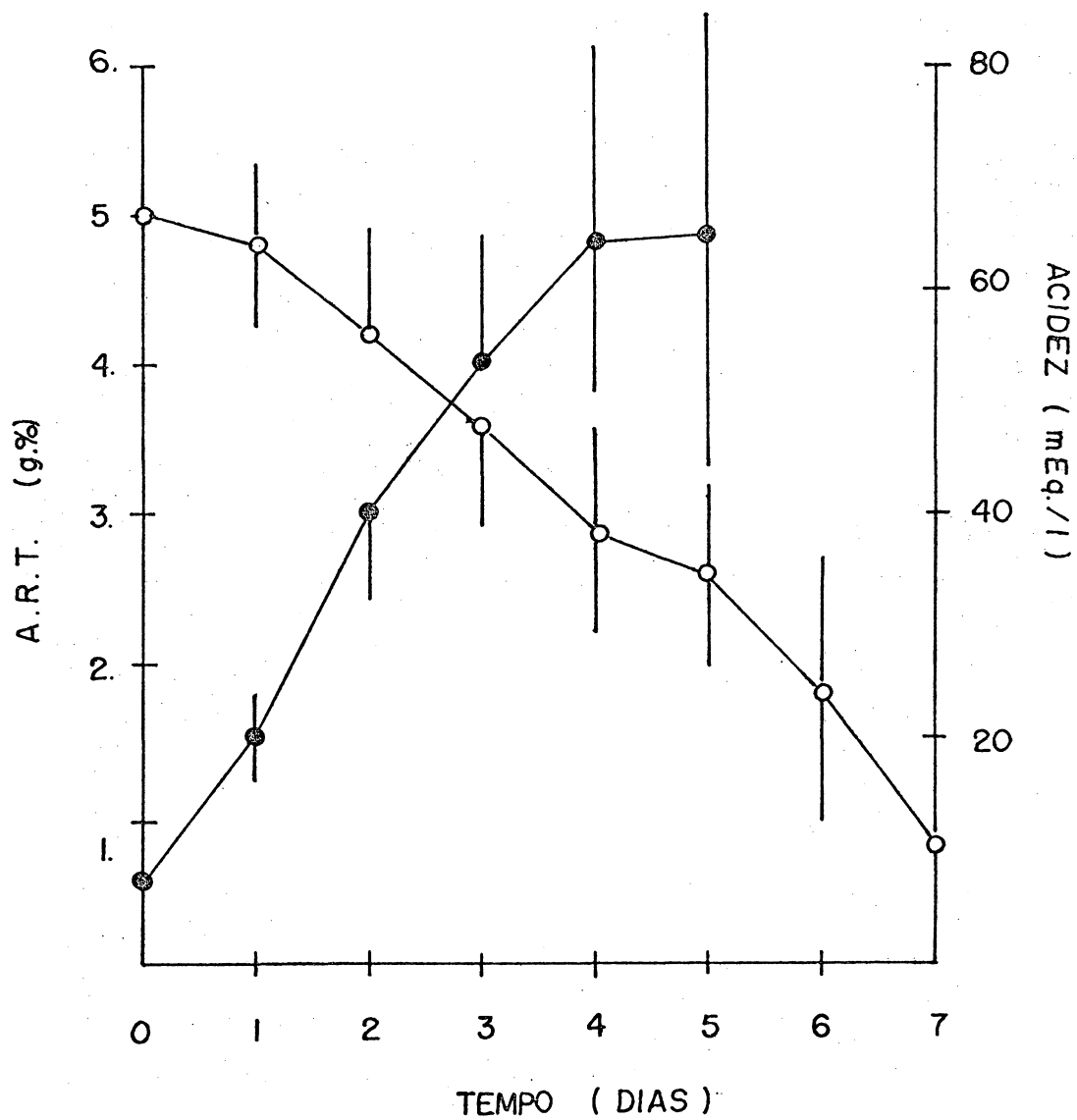


Figura 12 - FERMENTAÇÃO DOS AÇÚCARES PELO *Aspergillus niger* EM MEIO DE TRUB ACRESCIDO DE  $\text{CaCO}_3$

( o ) consumo de ART

( ● ) produção de ácido

Quando se admitiu a possibilidade de utilizar o TRUB para a produção de ácido glucônico por fermentação, observou-se o seu baixo teor em açúcares fermentescíveis, porém rico em sais minerais e nitrogênio protéico, conseqüentemente, considerou-se válida uma suplementação em fonte de carbono com matéria-prima rica em carboidratos. Nestas condições, o melaço de cana, um subproduto da Indústria Açucareira, cujo teor em açúcares está na média de 55% e que constitui matéria-prima por excelência para muitos processos fermentativos, seria a substância indicada para a complementação. Deve-se ainda considerar o custo relativamente baixo deste material, bem como a facilidade de aquisição do mesmo. Pelas razões expostas, foram executados experimentos utilizando-se o melaço juntamente com o macerado de trub. Neste caso o trub seria uma fonte de suplementação a sais minerais e alguns compostos necessários para o crescimento do fungo.

Na Figura 13 podemos observar que a produção de ácido foi da mesma ordem de grandeza que aquela de Moyer suprido com melaço, ou seja, 312,98 mEq/l, porém em tempo menor, ou seja, a fermentação ocorria em 7 dias. A curva de produção de ácido glucônico é também bifásica. Havia rápida formação do ácido nos primeiros dias e declinava até o 4º dia, ocorrendo súbito crescimento do 5º ao 7º dia, como se houvesse uma etapa de adaptação na conversão da glucose a ácido glucônico. O perfil de consumo de ART foi similar ao do meio de Moyer suplementado, porém com consumo maior.

#### *Fermentação do melaço*

A fim de saber o comportamento do melaço como fonte de

Carbono para a fermentação, sem nenhuma suplementação (Fig. 14), podemos ver que a produção do ácido ocorre de modo eficaz resultando na formação de 255 mEq/l do ácido glucônico, atingindo esse valor em 11 dias de fermentação, ou seja, um pouco mais lento do que em presença do trub e com taxa de 13% inferior.

Foi relatado por Mahmoud, em 1976 (44), que a produção de ácido glucônico por *Aspergillus niger* era favorecida quando se utilizava a glucose em pó como fonte de açúcar para fermentação, seguida por xarope de glucose e por último o melaço, em que os autores obtiveram rendimentos de 75,4%, 59,4% e 47,9%, respectivamente, na produção de ácido glucônico. Os autores ressaltam que o melaço, embora rico em açúcar e sais minerais, contém elementos inibitórios que constituem um problema para a fermentação industrial e que merece investigação.

Um fato interessante que pode ser observado nos experimentos realizados com o meio contendo o TRUB, foi que em todos eles houve melhor utilização dos açúcares. Enquanto a fermentação do melaço em meio de Moyer e o melaço sozinho continha ainda cerca de 10 a 16% em ART, o do meio em TRUB foi de 0,97%.

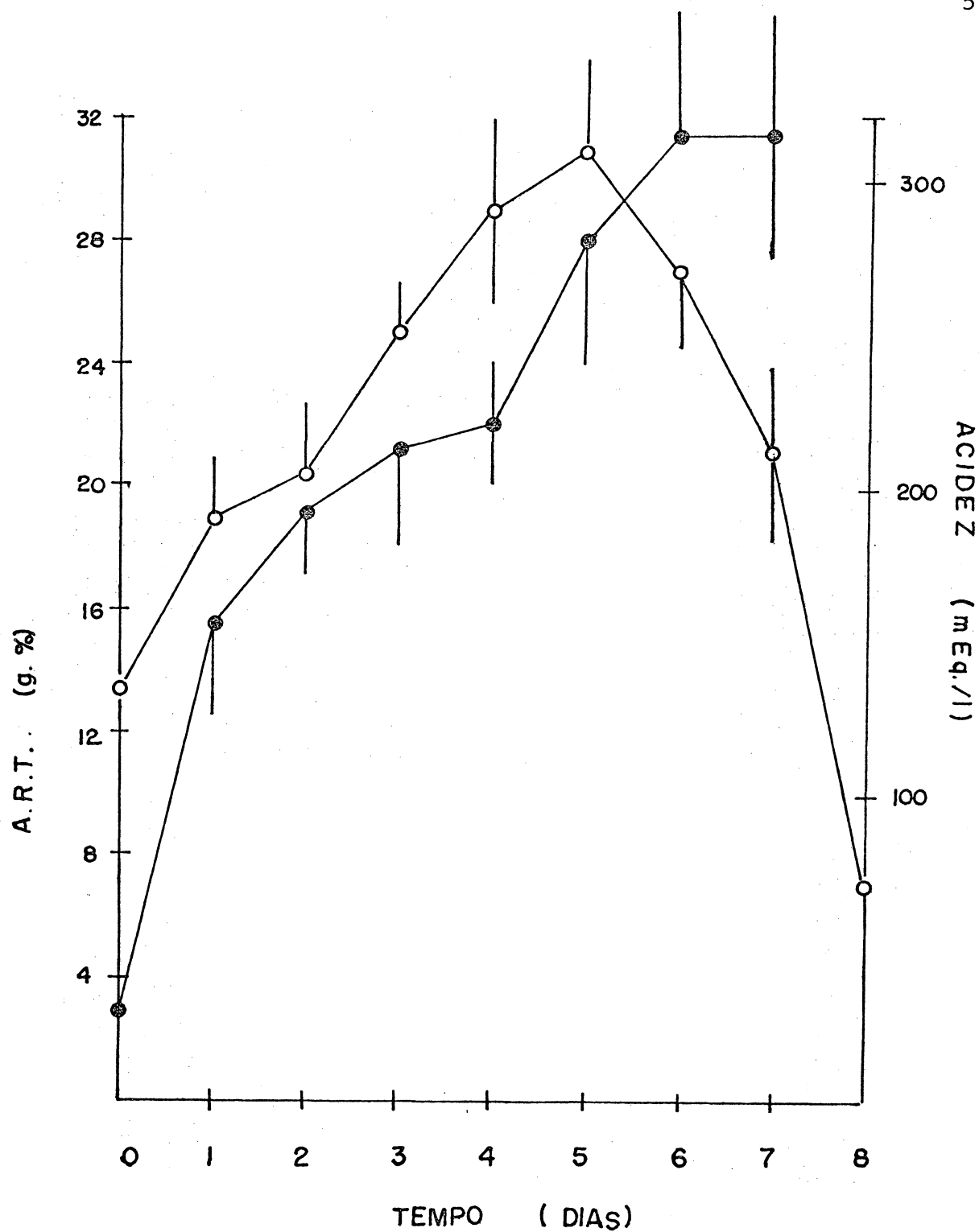


Figura 13 - FERMENTAÇÃO DO TRUB COM MELAÇO PELO *Aspergillus niger*.

( ● ) produção de ácido

( ○ ) consumo de ART



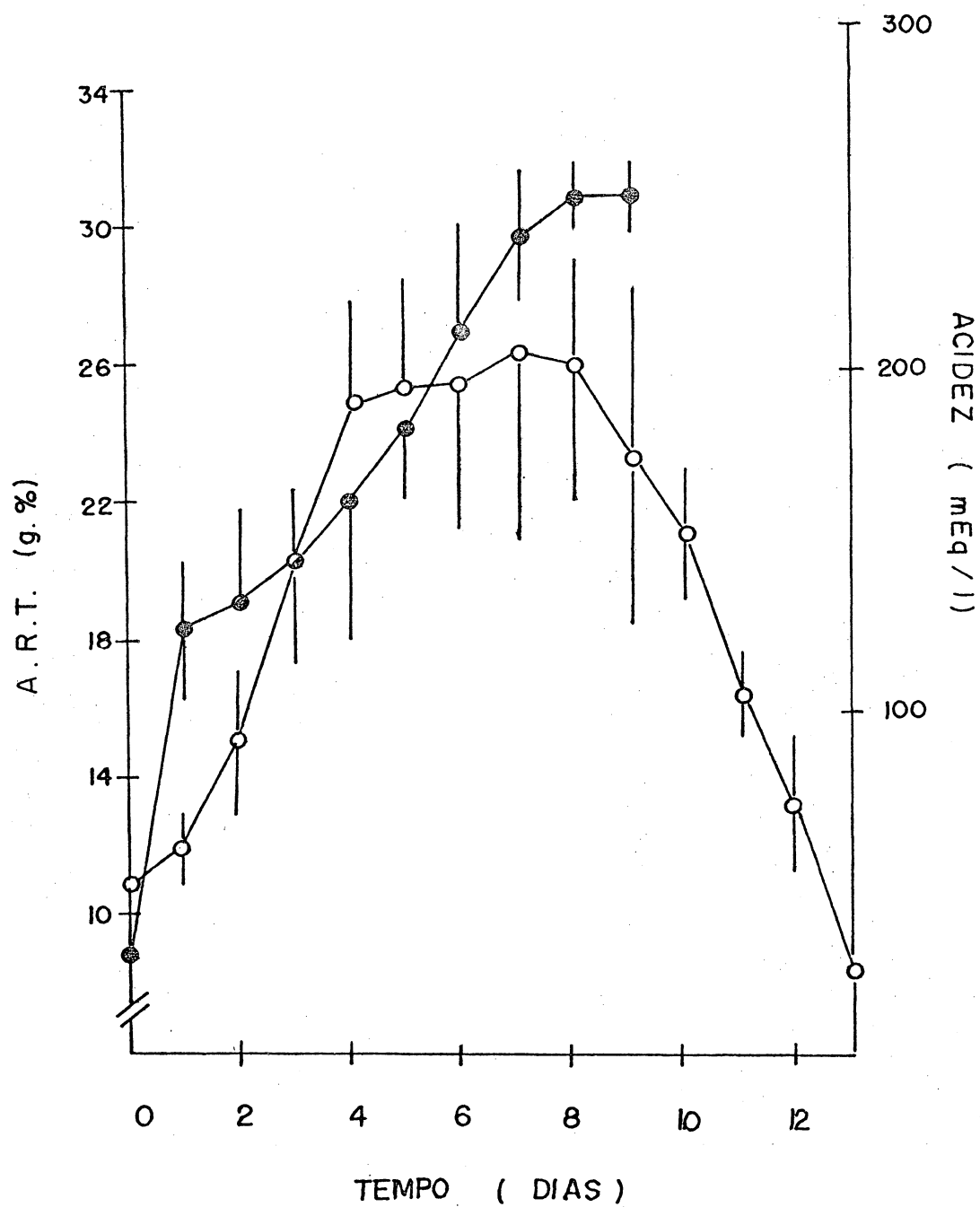


Figura 14 - FERMENTAÇÃO DO MELAÇO PELO *Aspergillus niger* EM MEIO CONTENDO SOMENTE O MELAÇO

( ○ ) consumo de ART

( ● ) produção de ácido

### *Reutilização do micélio*

Quando se reutilizou o micélio de um processo fermentativo, foi possível obter uma diminuição no tempo de fermentação e pequeno aumento na produção de ácido glucônico, como pode ser observado na Figura 15. O processo realizado foi semi-contínuo, conseguindo obter cerca de 57 mEq/l de ácido na fermentação do trub, sem adição de outros elementos. Em algumas etapas foi possível reduzir em até 47% o tempo de fermentação.

O trub não se revelou como uma matéria-prima eficiente para a produção de ácido glucônico. Possui os elementos minerais necessários, mas a quantidade de açúcar disponível é muito pequena para obter bom rendimento. A simples adição de  $\text{CaCO}_3$  não é suficiente para que haja um aumento substancial na produção.

O melaço, quando utilizado sozinho, não apresenta resultado satisfatório, talvez devido à ausência dos nutrientes minerais que quando acrescidos, como recomendado no meio sintético, eleva a produção.

A combinação do melaço com o trub parece atuar de maneira satisfatória.

No presente trabalho tentou-se obter a produção de ácido glucônico utilizando produtos de resíduos industriais e de matéria-prima de baixo custo, bem como processos fermentativos simples. Para tanto, foi utilizada fermentação estacionária a 29°C, e obteve-se um rendimento de 20% na produção de ácido quando a glucose era a fonte de carbono. Na Figura 16 podemos comparar a produção realizada em diferentes condições. A produção de ácido foi baixa quando se utilizou o meio de Moyer, meio de trub, meio de trub acrescido de  $\text{CaCO}_3$ . A suplementação com

melaço, em todos os experimentos, resultou no aumento da produção de ácido, sendo que a combinação melhor resultou da mistura do trub com melaço. Talvez a complementação com o  $\text{CaCO}_3$  que tem a capacidade de neutralizar os ácidos resultasse numa produção mais rendosa.

A fermentação utilizando melaço merece melhores estudos, utilizando condições aeróbicas ideais (alta oxigenação e agitação), para que o país possa usufruir dos produtos que têm tantas aplicações industriais e que poderiam ser obtidos de modo mais barato.

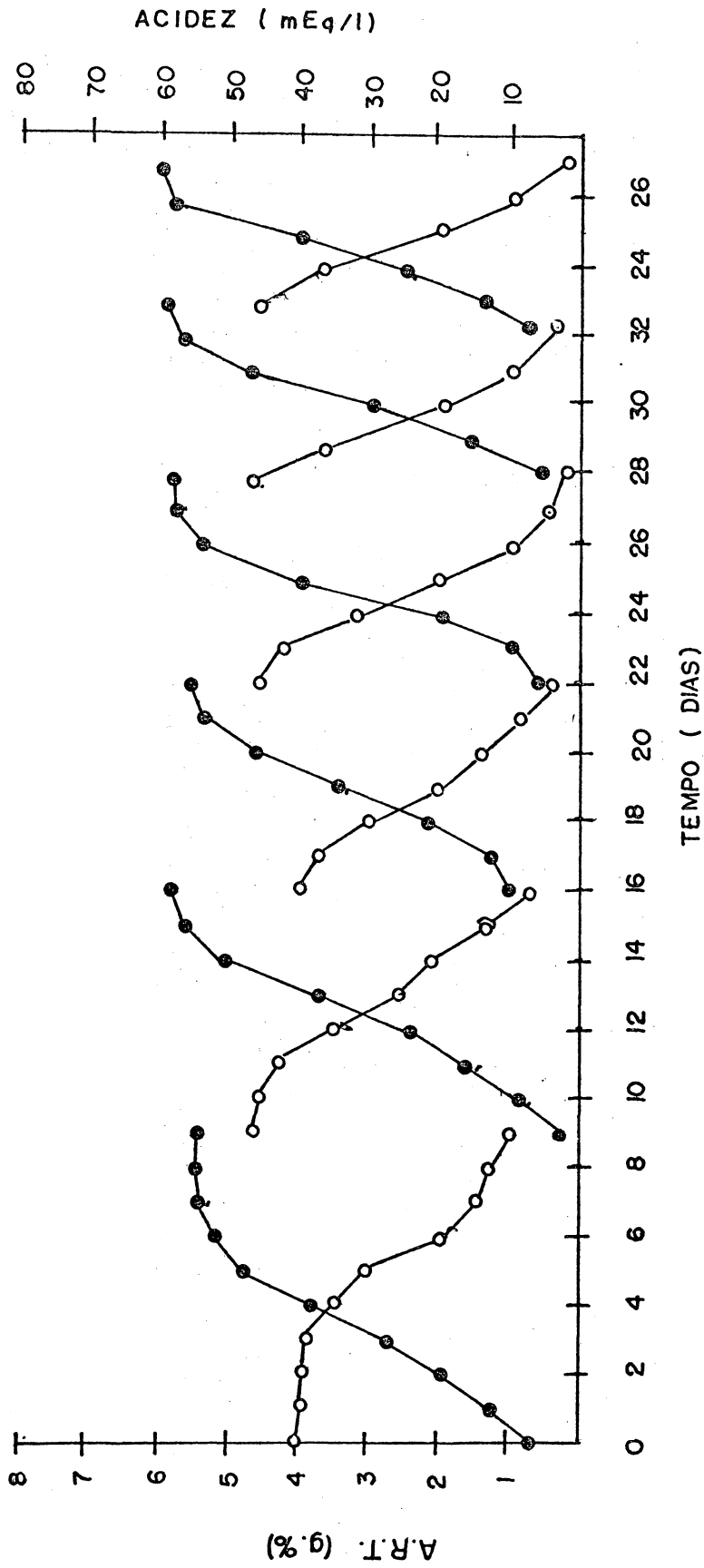


Figura 15 - PRODUÇÃO DE ÁCIDO GLUCÔNICO POR *Aspergillus niger* UTILIZANDO O MACERADO DE TRUB SOB CONDIÇÕES SEMI-CONTÍNUAS (REUTILIZAÇÃO DO MICÉLIO)

( ○ ) consumo de ART

( ● ) produção de ácido

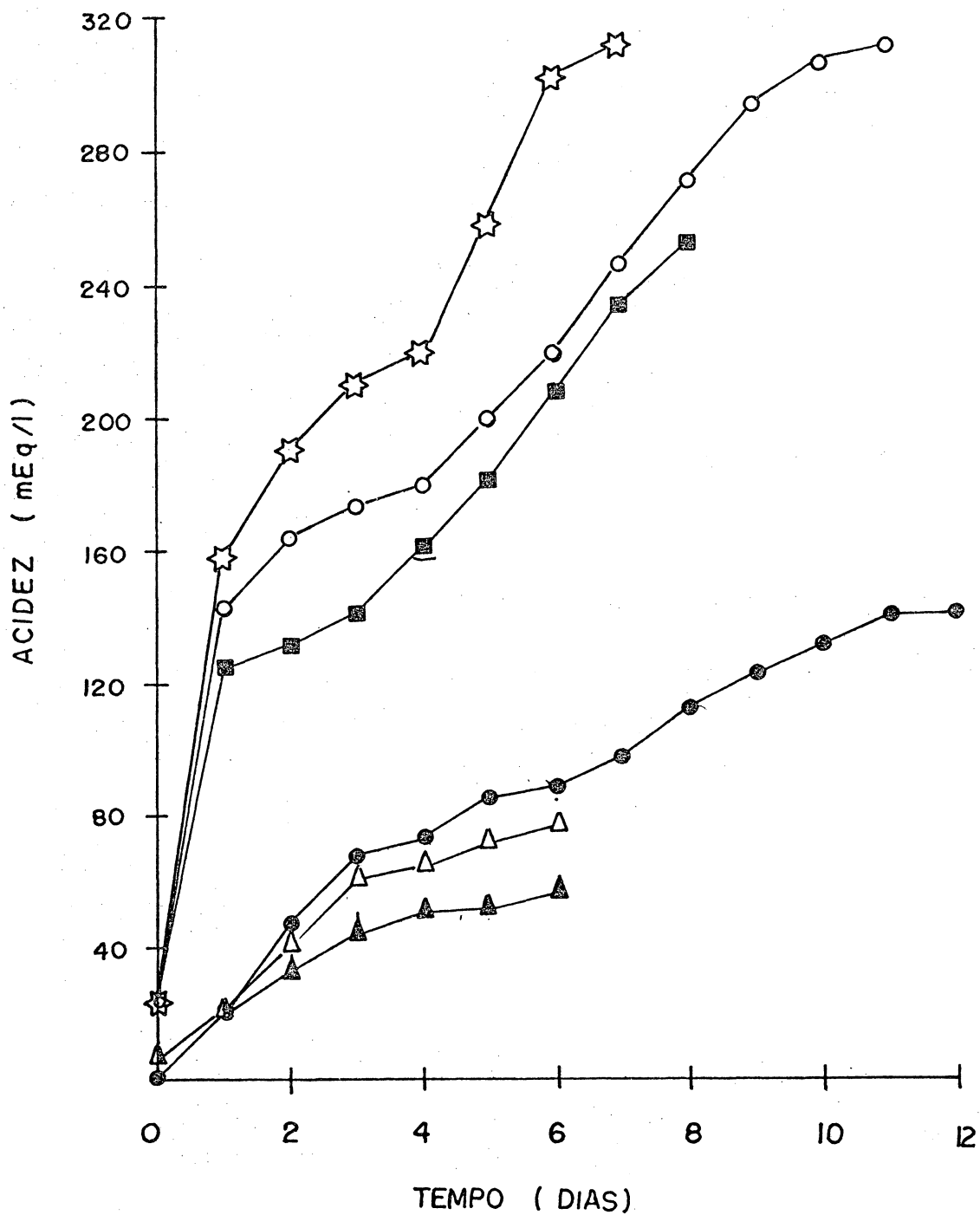


Figura 16 - FERMENTAÇÃO DE AÇÚCARES DO TRUB E NO MELAÇO EM DIFERENTES CONDIÇÕES, PELO *Aspergillus niger*.

- ( ○ ) Moyer mais melão ( ■ ) melão ( ● ) Moyer  
 ( ☆ ) TRUB mais melão ( ▲ ) TRUB  
 ( △ ) TRUB mais Carbonato de Cálcio

## 5 CONCLUSÕES

- a) O tempo ideal de maceração do TRUB é de 45 minutos.
- b) O meio preparado com macerado de TRUB acrescido de ágar, produz uma esporulação mais abundante do que o meio de Czapeck.
- c) A adição de  $\text{CaCO}_3$  ao TRUB produziu um aumento de 10,18% na produção de ácido, diminuiu o tempo de fermentação em 33%, a produção máxima foi obtida no 4º dia ao invés de no 6º dia.
- d) A reutilização do micélio germinado diminuiu em até 34% o tempo de fermentação e aumentou a quantidade de ácido produzido em até 0,85%.
- e) A quantidade de ácido produzida, utilizando-se o melão como complemento de açúcares para o TRUB é maior que a soma das quantidades produzidas por cada um destes isoladamente (55,17 mEq/l para o TRUB, 255,07 mEq/l para o melão e 312,98 mEq/l para a associação do melão com o TRUB).
- f) O macerado do TRUB obtido por extração aquosa (1:2) contém: 4% de açúcar total (3,9% de açúcar redutor e 0,1% de açúcar não redutor); 0,96% de Nitrogênio; 0,074% de Fósforo; 0,0013 de Potássio; 0,0049% de

Magnésio; 0,0006% de Cálcio. Entre os açúcares temos glicose, maltose e outros oligossacarídeos, galactose, sacarose. A hidrólise do TRUB "*in natura*" aumenta em 3,3 vezes o teor em açúcares redutores.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 ALMEIDA, J.R. Matérias primas. In: I Semana de Fermentação Alcoólica. Piracicaba. I.Z. ESALQ, 1965.
- 02 ARNAUD, A. & GUIRAUD, J.P. Bioquímica microbiana. In: Biotecnologia. São Paulo, Editora Manole Ltda., 1985.
- 03 ASSUMPÇÃO, R.M.V. & MORITA, T. Manual de soluções, reagentes e solventes. São Paulo, Editora Edgar Blucher, 1968.
- 04 BAK, T.G. & SATO, R. Studies on the glucose dehydrogenase of *Aspergillus oryzae*. In: Induction of its synthesis by benzoquinone and hydroquinone. Biochem. Biophys. Acta. 139:265-276, 1967.
- 05 BANCHER, E.J.; SHERZ, H. & KAINDL, K. Thin layer chromatography of carbohydrates. Anal. Acta II, (6):1043-1051, 1964.
- 06 BARCLAY, R. Upgrading spent grains. Brew. Guard, 3(7):18-19, 1982.
- 07 BARD, J. & PAIVA, M.P. Aproveitamento da vinhaça em piscicultura intensiva. Saccharum, (16):39-40, 1981.
- 08 BAVISOTTO, V.S. Edible products from spent grains and yeasts. US, 3, 212, 902, oct. 19, 1965.
- 09 BELLAMY, W.D. Single cell protein from Cellulosic Wastes. Biotech. Bioeng., 16:869-880, 1974.
- 10 BEN-GERA, I. & KRAMER, A. The utilization of food Industries Wastes. Adv. Food Res., 17:77-152, 1969.
- 11 BENNETT, G.F. & LASCH, L. Industrial Waste disposal made profitable. Chem. Eng. Progr., 70(2):75-85, 1974.
- 12 BENTLEY, R. & NEUBERGER, A. The mechanism of the action of Notatin. Biochem. J., 45:584-590, 1940.
- 13 BERNHARD, A. The use of Potassium in Hypopotassemia. Science, 113:751, 1951.
- 14 BERNHAUER, K. & SCHULOF, L.- U.S. 1,849,053, march, 15, 1932.



- 15 BLOM, R.H.; PFEIFER, V.F.; MOYER, A.J., TRAUFLER, D.H.; CONWAY, H.F.; CROCKER, C.K.; FARISON, R.E. & HANNIBAL, D.V. Sodium gluconate production. Fermentation with *Aspergillus niger*. Ind. Eng. Chem., 44(2):435-440, 1952.
- 16 BOSE, S.K. Observation on the Enzyme Sistem involved in the oxidation of Gluconic Acid by *Aspergillus niger*. J. Indian Chem. Soc., 24:327-337, 1946.
- 17 BRASIL. Diário Oficial. Seção I, Parte I, Suplemento ao número 181, 19 de set., 1974, p. 12.
- 18 BRISSOU, J. Techniques d'enzimologie bacterienne. Paris, Masson & Cie Editeurs, 1971.
- 19 BUCHBAUER, G. Analytical study of pharmaceutically important organic acids. Sci. Pharm., 40(4):259-262, 1972.
- 20 COUTHARD, C.E.; MICHAELIS, R.; SHORT, N.F.; SYKES, G.; SKRIMSHIRE, G.E.H.; STANDFAST, A.B.F.; BIRKINSHAW J.H. & RAISTRICK, H. Notatin: an anti-bacterial glucose-aerodehydrogenase from *Penicillium notatum* Westling. Nature, 150(3813):633-634, 1942.
- 21 \_\_\_\_\_. Notatin: an antibacterial glucose desidrogenase from *Penicillium notatum* Westling and *Penicillium resticulosum* sp. nov. Biochem. J., 39:24-36, 1945.
- 22 DAVIES, W.L. Spent hops as a feeding material. Fert. Feeding-Stuffs and Farm Suppl. J., (11).964, 1962.
- 23 DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A. & SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Anal. Chem., 28:350-356, 1956.
- 24 El cervecero en la practica. Un manual para la Industria Cervecera. Asociacion de Maestros Cerveceros de las Americas. Madison, Wisconsin, 1977.
- 25 FERGUSON, J.L. Dryers turns residual yeasts to brewer's profit. Food Eng., 47:57, 1975.
- 26 FOSTER, J.W. Chemical activities of fungi. New York, Academic Press, 1949. 648 p.
- 27 GALLOWAY, L.D. & BURGESS, R. Applied mycology and bacteriology. London, Leonard Hill Books Ltd., 1957.
- 28 GASTROCK, E.A.; PORGES, N.; WELLS, P.R. & MOYER, A.J. Gluconic acid production on pilot plant scale. Effect of variables on production by Submerged Mold Growths. Ind. Eng. Chem., 30(7):782-789, 1938.
- 29 Gluconic acid and sodium gluconate by glucose fermentation. Pabst Brewing Co. Germ. Offen. 1, 817, 907, 16 aug., 1973.
- 30 HALL, R.L. Do spent hops and spent grain press liquor ha-

- ve value? Proc. 3rd Ind. Waste Conf., Purdue Univ. Eng. Bull., Extension Ser. nr. 64:138-152, 1947.
- 31 HALNAN, E.T. Value of dried brewer's grain as a feeding material. J. Chem. Ind., 34:98, 1914.
  - 32 HANG, D.Y.; SPLITTSTOESSER, D.F. & WOODAMS, E.F. Utilization of brewery spent grain liquor by *Aspergillus niger*. Appl. Microbiol., 30(5):879-880, 1975.
  - 33 HAUSRATH, E. Use of hops residue in gardening. Chem. Zentr., 1:2696-2697, 1942.
  - 34 HERRICK, H.T. & MAY, O.E. The tproduction of gluconic acid by the *Penicillium luteum purpurogenum* group II. Some optimal conditions for acid formation. J. Biol. Chem., 77: 185-195, 1928.
  - 35 HERRICK, H.T.; HELLBACH, R. & MAY, O.E. Apparatus for the application of submerged mold fermentation under pressure. Ind. Eng. Chem., 27(6):681-683, 1935.
  - 36 HORWITZ, W. Official methods of analysis of the A.O.A.C. 12nd ed. Washington, D.C., A.O.A.C., 1975.
  - 37 KEILIN, D. & HARTREE, E.F. The use of glucose oxidase (Notatin) for determination of glucose in biological material and for the study of glucose producing systems by manometric methods. Biochem. J., 42:230-238, 1948.
  - 38 \_\_\_\_\_. Properties of glucose oxidase (Notatin). Biochem. J., 42:221-229, 1948.
  - 39 \_\_\_\_\_. Prostetic groups of glucose oxidase (Notatin). Natura, 157(15):801, 1946.
  - 40 LEWIS, H.V. Treatment of brewery waste. Chem. Eng. Progr. Symp. Ser., 67(108):173-176, 1971.
  - 41 LEWIS, N.J. Recycling some brewery wastes to the Brewerhouse. Process. Biochem., 11(3):4-5, 1976.
  - 42 LIPINSKY, E.S. & LITCHFIELD, J.H. Algae, bacterial and yeast as food or feed. Food Technol., 1:581-613, 1970.
  - 43 LOOSLI, J.K. & WARNER, R.G. Distillers grain, brewer's grain and urea as protein suplemente for dairy rations. J. Dairy Sci., 41:1445-1450, 1958.
  - 44 MAHMOUD, S.A.Z.; EL-SAWY, M. & NOUR EL-DINIBRAHIM, O.O. Studies on some nutritional factors influencing the production of gluconic acid. Zentr. Bakt. Paras. Infek. den Hyg., 131(4):351-374, 1976.
  - 45 MAY, O.E.; HERRICK, H.T.; MOYER, A.J. & HELLBACH, R. Semi-plant scale production of gluconic acid by mold fermentation. Ind. Eng. Chem., 21(12):1198-1203, 1929.

- 46 MAY, O.E.; HERRICK, H.T.; MOYER, A.J. & WELLS, P.A. Gluconic acid production by submerged mold growths under increase air pressure. Ind. Eng. Chem., 26(5):575-578, 1934.
- 47 MOHLMAN, F.W. The industrial waste problem. I-Packing house, Brewery and by-products coke wastes. Sewage Works J., 19(3):473-477, 1947.
- 48 MOLLIARD, M. Compt. rend. 174, 881, 1922. In: Foster, J.W. Chemical activities of fungi. New York, Academic Press, 1949. 648 p.
- 49 MOYER, A.J.; WELLS, P.A., STUBBS, J.J.; HERRICK, H.T. & MAY, O.E. Gluconic acid production. Development of inoculum and composition of fermentation solution for gluconic acid production by submerged mold growths under increased air pressure. Ind. Eng. Chem., 29(7):777-781, 1937.
- 50 MOYER, A.J.; UMBERGER, E.J. & STUBBS, J.J. Fermentation of concentrated solutions of glucose to gluconic acid. Ind. Eng. Chem., 32(10):1379-1383, 1940.
- 51 MOYER, R.C. & STORK, R. Properties of ribosomes and R.N.A. from *Aspergillus niger*. Arch. Biochem. Biophys., 104:193-194, 1964.
- 52 NARZISS, L. Abriss der bierbrauerei. Stuttgart, Ferdinand Enke Verlag, 1980.
- 53 OGURA, Y. Studies on the glucose dehydrogenase of *Aspergillus oryzae*. J. Biochem. (Tokyo), 28:75-84, 1951.
- 54 OLBRICH, H. O melaço. Rio, Instituto do Açúcar e do Alcool, 1960.
- 55 PITT, D.; MOSLEY, M.J. & BARNES, J.C. Glucose oxidase activity and gluconate production during calcium induced conidiation *Penicillium notatum* in submerged culture. Trans. Br. Mycol. Soc., 81(1):21-29, 1976.
- 56 POMERANZ, Y. Single cell protein from by-products of malting and brewing. Brew. Dig., 51(1):49-55, 1976.
- 57 PORGES, N.; CLARCK, T.F. & GASTROCK, E.A. Gluconic acid production: repeated use of submerged *Aspergillus niger* for semicontinuous production. Ind. Eng. Chem., 32(1):107-111, 1940.
- 58 PORGES, N.; CLARCK, T.F. & ARONOVSKY, S.I. Gluconic acid production: repeated recovery and re-use of submerged *Aspergillus niger* by filtration. Ind. Eng. Chem., 33(8):1065-1067, 1941.
- 59 PRESCOTT, F.J.; SHAW, J.K.; BILELLO, J.P. & CRAGWELL, G.O. Gluconic acid and its derivatives. Ind. Eng. Chem., 45(2):338-342, 1953.

- 60 ROBERTS, B.K.; MIDGLEY, M. & DAWES, E.A. The metabolism of 2-oxoglucuronate by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Gen. Microbiol., 78:319-329, 1973.
- 61 ROCHA LIMA, L. Opções brasileiras para a industrialização do álcool etílico. Revista Paranaense de Desenvolvimento, nº 58, 1977. Curitiba.
- 62 SELVENDRAN, R.R. MARCH, J.F. & RING, S.G. Determination of aldoses and uronic acid content of vegetable fiber. Anal. Biochem., 96:282-292, 1979.
- 63 SHANNON, L.J. & STEVENSON, K.E. Growth of *Calvatia gigantea* and *Candida stearolytica* in brewery wastes for microbial protein production and BOD reduction. J. Food Sci., 40(4): 830-832, 1975.
- 64 STAHL, E. Thin-layer chromatography. Berlin, Springer Verlag, 1979.
- 65 SULLIVAN, T.W.; KUHL, H.J.; HOLDER, D.P. Evaluation of brewer's dried grains and yeast in turkey diets. Poult. Sci., 57(5):1329-1336, 1978.
- 66 SUMMER, J.B. The estimation of sugar in diabetic urine using dinitrosalicilic acid. J. Biol. Chem., 62(2):287-290, 1924/1925.
- 67 TERRA, B. Química orgânica. 4.ed. Rio de Janeiro, Científica, 1952.
- 68 TURLEJ, J. & ROMOTWSKI, T. Fertilizer from brewer wastes. Pol. 50, 339, nov. 2, 1965.
- 69 VEIGA, L.A. & CHADELIER, E.L. Detection and differentiation on paper chromatography by the p-anisidine/periodate reaction. Anal. Biochem., 20:419-422, 1967.
- 70 VILELA, G.G.; BACILA, M. & TASTALDI, H. Técnicas e Experimentos em bioquímica. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 1973.
- 71 WELLS, P.A.; MOYER, A.J.; STUBBS, J.J.; HERRICK, H.T. & MAY, O.E. Gluconic acid production. Effect of pressure, air flow, and agitation on gluconic acid production by submerged mold growths. Ind. Eng. Chem., 29(6):653-656, 1937.