

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
LAB. DE PESQUISAS EM QUÍMICA INORGÂNICA E ANALÍTICA – LPQIA



**CARACTERIZAÇÃO E COMPORTAMENTO SACARIFICANTE DA FLORA
MICROBIANA EMPREGADA NA FABRICAÇÃO DA AGUARDENTE DE
MANDIOCA (TIQUIRA)**

Mestrando: Diogo Marcelo Lima Ribeiro

Orientador: Profº Dr. Cícero W. B. Bezerra

São Luís - MA

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**CARACTERIZAÇÃO E COMPORTAMENTO SACARIFICANTE DA FLORA
MICROBIANA EMPREGADA NA FABRICAÇÃO DA AGUARDENTE DE
MANDIOCA (TIQUIRA)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Química da
Universidade Federal do Maranhão como parte
dos requisitos exigidos para a obtenção do título
de Mestre em Química Analítica.

Orientador: Profº Dr. Cícero W. B. Bezerra.

Ribeiro, Diogo Marcelo Lima.

Caracterização e comportamento sacarificante da flora microbiana empregada na fabricação da aguardente de mandioca (tiquira)/ Diogo Marcelo Lima Ribeiro. – São Luís, 2011.

79 f.

Impresso por computador (fotocópia).

Orientador: Cícero W. B. Bezerra.

DIOGO MARCELO LIMA RIBEIRO

**CARACTERIZAÇÃO E COMPORTAMENTO SACARIFICANTE DA FLORA
MICROBIANA EMPREGADA NA FABRICAÇÃO DA AGUARDENTE DE
MANDIOCA (TIQUIRA)**

Aprovado em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Cícero W. B. Bezerra
(Orientador)
Departamento de Química - UFMA

Prof^a. Dr^a. Cristina de Andrade Monteiro
Departamento de Biologia - IFMA

Prof^o. Dr. Maurício Boscolo
Departamento de Química e Ciências Ambientais – UNESP-Rio Preto

São Luís - MA
2011

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Santa Maria por ter me proporcionado esse momento e iluminado meu caminho sempre.

Aos meus pais Francisco Ribeiro e Carmem Ribeiro, agradeço o amor, os conselhos, o incentivo, por sempre acreditarem em mim e por ter me tornado a pessoa que sou.

A minha esposa Luciana, a quem amo, pelo companheirismo, amor, compreensão e grande ajuda para realização deste trabalho.

As minhas filhas Luíza e Marissa, por me mostrarem o sentido do amor e ser mais um incentivo para o término deste trabalho.

A minha tia Zita (*em memória*) que sempre contribuiu para o meu crescimento.

Ao meu professor orientador Dr. Cícero W. B. Bezerra, pelo voto de confiança, incentivo e conhecimento compartilhado durante a realização deste trabalho.

A minha co-orientadora professora Dr^a. Cristina de Andrade Monteiro, pela orientação, por ter percebido que a pesquisa fará parte da minha vida e por ter compartilhado seu vasto conhecimento na área.

Aos amigos Marinaldo, Patrícia, Jorge, Tâmara, Dilana, Ana Cléa, Aquiles pelo incentivo e auxílio durante a realização dos experimentos.

Aos colegas de curso Thaís, Sergiane, Sinara, Waléria, Shalcher, Erickson pelos momentos de estudo e descontração.

Aos alunos de graduação Edmar e David pelo apoio durante a realização deste projeto.

Às professoras Tânia, Larissa, Mariah pela grande ajuda e disposição em me ajudar.

Às minhas queridas irmãs Pollyanna e Ana Paula e sobrinha Gabriela pelo apoio e contribuição neste trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento dessa pesquisa.

*“A melhor maneira que o homem
dispõe para se aperfeiçoar é
aproximar-se de Deus.”*

Pitágoras

RESUMO

A Tiquira é uma bebida alcoólica destilada e preparada a partir da sacarificação e posterior fermentação da mandioca. Os processos de sacarificação e fermentação são realizados por micro-organismos que se desenvolvem naturalmente nos beijos expostos ao meio ambiente. O crescimento desses micro-organismos ocorre por um período aproximado de 8 dias e, como são diversas as linhagens coletadas, o rendimento do processo bem como a qualidade do destilado ficam comprometidos. O objetivo deste trabalho é, portanto, o de contribuir para a obtenção de uma maior qualidade da aguardente de mandioca (Tiquira) produzida no estado do Maranhão através da identificação e seleção dos melhores micro-organismos sacarificantes e fermentativos empregados no processo artesanal. As cepas selecionadas foram submetidas a estudos, onde identificamos a presença de fungos filamentosos, bactérias e uma levedura. Foram identificadas 3 (três) espécies de fungos filamentosos: *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Rhizopus oryzae*, os quais foram testados perante o seu poder de esporulação em diferentes meios de cultura a 30°C, tendo o meio SDA (Saboroud Dextrose Ágar) fornecido a melhor composição para a obtenção do crescimento dos fungos mais rapidamente. As amostras de *R. oryzae*, *A. niger*, *A. flavus* e a mistura destes esporos, que previamente mostraram ser melhores produtoras enzimáticas foram selecionadas para testes de sacarificação do amido para avaliar e confirmar a capacidade de conversão à glicose. A cepa *R. oryzae* alcançou um valor de conversão de 78,02% em média utilizando-se uma temperatura padrão de 30°C, quantidade de esporos $5,5 \times 10^7$, pH 5 e 50g/l de amido solúvel, obtendo o maior rendimento de sacarificação, seguida pelo *A. flavus* 71,55% , *A. niger* 57,17% e mistura dos esporos 48,02%. Portanto, evidencia-se que a utilização de micro-organismos filamentosos autóctones torna-se uma opção para uso em sacarificação de amostras amiláceas.

Palavras-chave: Amido; Sacarificação; Fungos Filamentosos; Tiquira.

ABSTRACT

The Tiquira is a distilled alcoholic beverage prepared from the saccharification and subsequent fermentation of cassava. The processes of saccharification and fermentation are performed by micro-organisms that grow naturally in beijos exposed to the environment. The growth of these micro-organisms occurs over a period of approximately 8 days and as many strains are collected, the process yield and the quality of distillate are compromised. The objective is therefore to improve the quality of spirit cassava (Tiquira) produced in the state of Maranhão through the identification and selection of the best micro-organisms and fermentation and saccharifying employed in artisanal process. The selected strains were subjected to studies, which identified the presence of filamentous fungi, bacteria and yeast. We identified three (3) species of filamentous fungi: *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* and *Rhizopus oryzae*, which were tested before their power of sporulation in different culture media at 30°C, and the SDA medium provided the best composition for obtaining the fungal growth more quickly. Samples of *R.oryzae*, *A.niger* and *A.flavus* previously shown to be the best producers were selected for testing enzymatic saccharification of starch to evaluate and confirm the ability of conversion to glucose. The strain *R. oryzae* reached a conversion value of 78.02% on average using a standard temperature of 30°C, amount of 5.5×10^7 spores, pH 5 and 50g/l of soluble starch, giving a greater yield of saccharification, followed by *A.flavus* 71.55%, *A.niger* 57.17% and mixture of spores 48,02%. Therefore, it is evident that the use of filamentous micro-organisms native becomes an option for use in starch saccharification samples.

Keywords: Starch; Saccharification; filamentous fungi; tiquira.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS...	x
LISTA DE FIGURAS...	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xii
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
CAPÍTULO 1 INTRODUÇÃO	14
CAPÍTULO 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Matéria-prima.....	18
2.1.1 Mandioca.....	18
2.1.2 Beiju da mandioca	19
2.1.3 Amido.....	20
2.1.3.1 Gelatinização do amido	21
2.1.3.2 Estrutura do amido	22
2.1.3.3 Principais enzimas que agem sobre o amido	23
2.2 Processamento da tiquira	25
2.2.1 Agentes da fermentação.....	26
2.2.1.1 Fungos.....	26
2.2.1.2 Leveduras alcoólicas	27
2.2.1.3 Leveduras selvagens	29
2.2.1.4 A espécie <i>Sachromyces cerevisiae</i>	29
2.2.1.5 Fungos filamentosos	30
2.2.1.5.1 Fungos do gênero <i>Aspergillus</i>	31
2.2.1.5.2 Fungos do gênero <i>Rhizopus</i>	32
2.2.2 Fatores que influenciam no crescimento	33
2.3 Hidrólise enzimática (Sacarificação).....	34
2.4 Fermentação (em andamento).....	35
2.5 Destilação.....	37
CAPÍTULO 3 MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1 Coleta.....	40
3.2 Isolamento dos micro-organismos.....	40
3.3 Identificação dos micro-organismos.....	41
3.4 Microcultivo.....	42
3.5 Conservação das cepas.	43
3.6 Preparo das soluções de esporos de <i>A. niger</i> e <i>A.flavus</i>	44
3.7 Preparo das soluções de esporos <i>Rhizopus</i>	45
3.8 Contagem de esporos de <i>Aspergillus</i> e <i>Rhizopus</i>	45
3.9 Sacarificação.....	47
3.11 Análise do substrato fermentado.	48
3.11.1 Sacarificação.....	48
3.11.2 Determinação de glicose.....	49
3.11.2.1 Curva analítica padrão de glicose.....	51
3.12 Rendimento do processo de sacarificação	52
CAPÍTULO 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	54

4.1 Isolamento e identificação dos Micro-organismos.....	54
4.2 Sacarificação.....	57
4.3 Rendimento do processo de sacarificação.....	62
CAPÍTULO 5 CONCLUSÕES	65
6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	66
CAPÍTULO 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
ANEXO 1.....	76
ANEXO 2.....	77
ANEXO 3.....	78

LISTA DE TABELAS

TABELA 1:	Quantidade de glicose (g/l) produzida através do processo de sacarificação do amido pelas espécies <i>A.niger</i> , <i>A. flavus</i> , <i>R. oryzae</i> e pela mistura dos esporos pré selecionadas por sacarificação.	60
TABELA 2:	Rendimento do processo de Sacarificação de uma suspensão de amido 50g/l, após, 192h com uma concentração de esporos $5,5 \times 10^7$ a 30°C.	62
TABELA 3:	Rendimento do processo de Sacarificação encontrado por autores que utilizaram o amido como matéria-prima.	64

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1:	Beiju de Mandioca após 8 dias de incubação apresentado grandes quantidades de micro-organismos.	20
FIGURA 2:	Estrutura química da molécula de Amilose (a) e Amilopectina (b)	23
FIGURA 3:	Ação das Enzimas Amilolíticas	24
FIGURA 4:	Conversão estequiométrica da glicose a etanol e dióxido de carbono	37
FIGURA 5:	Etapas da diluição seriada do beiju de mandioca para posterior semeadura em placas de Petri m diferentes meios de cultura	41
FIGURA 6:	Preparo da técnica adaptada de microcultivo	42
FIGURA 7:	Placas de microcultivo após quatro dias de incubação a 30°C	43
FIGURA 8:	Lâminas prontas para visualização ao microscópio óptico	43
FIGURA 9:	Ilustração de tubo de ensaio contendo meio SDA inclinado para repicagem das espécies	44
FIGURA10:	Contagem de esporos em câmara de Neubauer	46
FIGURA11:	Fluxograma do processo de isolamento e identificação dos micro-organismos encontrados no beiju de mandioca.	47
FIGURA12:	Sacarificação em frasco (balão)	48
FIGURA13:	Análise do substrato	49
FIGURA14:	Teste Somogyi-Nelson para análise de glicose produzida	51
FIGURA15:	Curva Analítica Padrão de Glicose	52
FIGURA16:	Crescimento das cepas de <i>A.niger</i> , <i>Rhizopus oryzae</i> e <i>A. flavus</i> por 48h em diferentes meios de cultura, a) SDA, b)PDA e c)Ex.Malte a 30°C.	54
FIGURA17:	Imagem do fungo <i>Aspergillus niger</i> obtida por microcultivo em SDA visto ao microscópio óptico (aumento 40X)	55
FIGURA18:	Imagem do fungo <i>Rhizopus oryzae</i> obtida por microcultivo em SDA visto ao microscópio óptico (aumento 10x a e 40x b)	56
FIGURA19:	Imagem do fungo <i>Aspergillus Flavus</i> obtida por microcultivo em SDA visto ao microscópio óptico (aumento 40X)	56
FIGURA20:	Resultado da identificação de levedura, sendo o laudo positivo para a espécie <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	57
FIGURA21:	Resultados da cinética de sacarificação do amido por um período de 72h	61

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°GL	Grau Gay-Lussac
G	Gramas
ml	Mililitro
Mg	Miligrama
L	Litro
V	Volume
α	Alfa
β	Beta
PET	Politereftalato de etileno
SDA	Saboroud Dextrose Agar
PDA	Potato Dextrose Agar (Ágar Batata Dextrose)
Ex.	Extrato
pH	Potencial Hidrogeniônico
°C	Graus Celsius
S.	Saccharomyces
A.	Aspergillus
Spp.	Espécie
Sp.	Espécies
Rpm	Rotação por minuto
H	Horas
HUPD	Hospital Universitário Presidente Dutra
R.	Rhizopus
OMS	Organização Mundial de Saúde
μ l	Microlitro
ART	Açúcares Redutores Totais



Capítulo 1

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A constante busca por fontes renováveis para a produção de energia, paralela à produção e à crescente monopolização da produção do petróleo, tem levado à procura de matérias-primas mais baratas. Um exemplo de alternativa é o uso da mandioca na produção de álcool com a contínua hidrolização do amido, seja através da aplicação de enzimas comerciais, seja pela cultura de fungo selvagem.

No Brasil, o Maranhão é o principal produtor da tiquira, com fabricação concentrada nas cidades de Barreirinhas, Santa Quitéria e Humberto de Campos. A produção da bebida é artesanal e sua comercialização se faz no mercado informal, não havendo dados estatísticos de produção e nenhum registro de produtor no Ministério da Agricultura. (VENTURINI FILHO; MENDES, 2003).

De acordo com o Decreto nº 2314 de 1997, que regula a padronização e a fiscalização da produção de bebidas no Brasil, a tiquira é conceituada como uma bebida com graduação alcoólica de 36 a 54^o GL, obtida do destilado alcoólico de mandioca (sacarificado).

Segundo a legislação, a tiquira pode conter até 30g de açúcar/L. Quando a quantidade de açúcar adicionado for superior a 6g/L, a denominação deve ser seguida da palavra adoçada. O coeficiente de congêneres (impurezas voláteis não etanol) não pode ser inferior a 200 e nem superior a 650 mg por 100mL de álcool anidro (VENTURINI FILHO; MENDES, 2003).

A produção de álcool a partir de mandioca, de acordo com Santana (2007), apresenta algumas dificuldades técnicas e econômicas. A necessidade de hidrólise do amido gera elevação dos custos aliada à baixa produtividade agrícola, não tornando esse processo viável economicamente. Diante disso, o estudo de melhorias no processo tecnológico de produção e melhorias agronômicas da cultura são pontos cruciais para utilização dessa cultura como fonte de carboidratos para produção de etanol.

Como a mandioca é rica em amido, anterior a etapa da fermentação deve acontecer o processo de sacarificação. Tanto esta, quanto a fermentação são etapas que acontecem com a participação de micro-organismos. Entretanto, diferentemente da cachaça, cuja produção usa uma única espécie (*Saccharomyces cerevisiae*), na produção da tiquira, diversas são as linhagens presentes. Como toda produção é artesanal, as cepas são colhidas ao acaso, sobre beijos preparados da massa de

mandioca, e ambientados em atmosfera úmida, colocados em local sombreado, mas suficientemente quente para permitir o crescimento de bolores, cujos esporos são naturais daquela região.

No início, os bolores crescem apenas superficialmente e, depois de alguns dias o micélio penetra no interior do beiju, hidrolisando o amido através da atividade de enzimas amilolíticas exógenas (VENTURINI FILHO; MENDES, 2003). A sacarificação ocasionada por estes micro-organismos geralmente se dá por um período de oito dias. Após esse tempo, os beijos são cortados e imersos em água, permanecendo por mais oito dias até a destilação do vinho.

A importância destes micro-organismos no processo não pode ser negligenciada. As diversas linhagens selvagens empregadas nas distintas, mas concomitantes etapas de sacarificação e fermentação, nem sempre permitem um balanço uniforme dos componentes minoritários. Com tantos micro-organismos assim, e por um período de oito dias, processos paralelos são esperados, diminuindo o rendimento da conversão e a qualidade do produto.

Assim, o emprego de diversas linhagens inviabiliza a tentativa de controle da composição dos componentes minoritários e, por conseguinte, da padronização da bebida. Além do mais, o tempo e o rendimento da produção, parâmetros indispensáveis para o controle do processo, perdem o sentido na prática.

Segundo Venturini Filho (2005, p.526):

Os ameríndios preparavam diversas bebidas a partir de diferentes matérias-primas, incluindo frutas e amiláceos como milho e mandioca. A maioria das referências sobre as bebidas, fermentadas ou não, à base de mandioca, têm a região amazônica como origem, tendo sido a Tiquira descrita como preparada por índios do Pará e Amazonas.

Para Venturini Filho (2005), a causa desta bebida estar desaparecendo do Estado do Maranhão, é o seu processo artesanal, tornando-a sem condições de competir com os baixos preços da aguardente de cana que vem do sudeste.

O autor coloca ainda que:

A transformação de amido de mandioca em açúcares (liquefação e sacarificação) é feita por bolores autóctones que surgem sobre os beijos. A fermentação alcoólica também é feita por leveduras selvagens. Esse tipo de produção tradicional é demorado e de baixo rendimento. Para alterar esse padrão, o processo deverá ser modernizado, sem alterar as características da bebida e sem se tornar complicado demais, com tecnologia adequada as comunidades rurais (VETURINI FILHO, 2005, p. 526).

Entre as bebidas derivadas da mandioca, apenas a tiquira possui legislação específica. Assim como outras aguardentes, a tiquira é uma bebida calórica, principalmente em razão de seu teor alcoólico. A graduação alcoólica mínima especificada pelo Ministério da Agricultura e do Abastecimento (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2004) é de 38% Volume. Entretanto, essa graduação dificilmente é aferida, em razão do nível artesanal de sua fabricação e da comercialização dispersa.

Assim, como objetivo do presente estudo se faz conveniente a contribuição para o estabelecimento de um ‘processo ideal’ de produção da tiquira, através da análise de sacarificação, para que se possa estabelecer as condições ótimas de trabalho e imprimir qualidade ao destilado.

Dentro desse contexto, o objetivo geral do trabalho consiste em contribuir para a obtenção de uma maior qualidade da aguardente de mandioca (Tiquira) produzida no estado do Maranhão através da identificação e seleção dos melhores micro-organismos sacarificantes e fermentativos empregados no processo artesanal e os objetivos específicos são:

- Caracterizar a flora microbiana presente no beiju de mandioca;
- Quantificar a atividade sacarificante das espécies isoladas;
- Propor um meio eficiente para o crescimento das linhagens;
- Acompanhar o processo de Sacarificação enzimática para verificar qual fungo filamentoso apresenta maior rendimento;



Capítulo 2

Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 MATÉRIA-PRIMA

2.1.1 Mandioca

A *Manihot esculenta* cranz, bastante conhecida como mandioca, é uma raiz com alto teor de amido bastante cultivada em regiões tropicais. É originada no Brasil, especificamente na região amazônica e se constitui em alimento energético para mais de 500 milhões de pessoas no mundo, sobretudo em países em desenvolvimento onde é cultivada por pequenos produtores e com baixa produtividade. Em área cultivada, a mandioca ocupa o sétimo lugar no mundo (CHISTÉ, 2006).

De acordo com Prado (2002) o Brasil é o segundo maior produtor mundial de mandioca, também conhecida como macaxeira, aipim ou castelinha. Esta raiz é cultivada em todos os estados brasileiros, situando-se entre os nove primeiros produtores agrícolas do país, em termo de área cultivada, e o sexto em valor de produção.

Segundo Santana (2007), a mandioca é uma raiz tuberosa da família *Euphorbiaceae*, rica em amido e muito consumida na dieta brasileira. É uma cultura que pode ser encontrada tanto em terras de alta fertilidade, como é o caso do sul do país, como no semi-árido, em algumas regiões do Nordeste.

Uma parte da produção é destinada à obtenção de farinha ou usada diretamente no consumo alimentar e o restante é destinado à industrialização, que consiste basicamente na extração de amido. O Brasil ocupa a segunda posição na produção mundial de mandioca, participando com 12,5% do total. A mandioca é cultivada em todas as regiões do país, assumindo destacada importância na alimentação humana e animal, além de ser utilizada como matéria-prima em vários produtos industriais (SPIER, 2005).

Devido a sua grande quantidade de carboidratos, a mandioca se apresenta com grande potencial para a geração de etanol. Chegou-se a implantar algumas usinas de álcool de mandioca no Brasil em períodos de grande dificuldade energética, como nas décadas de 1930 e 1970. Enquanto a produção de álcool de cana de açúcar era aperfeiçoada em diversos aspectos tecnológicos e econômicos, a produção de álcool de mandioca era abandonada, sem maiores investimentos e estudos (SANTANA, 2007).

Em relação à fécula de mandioca, conforme citado por Coelho (2002), ela é considerada o amido de raízes e tubérculos, sendo obtida a partir da mandioca lavada, descascada e ralada para extração. O bagaço e o leite da fécula são separados, sendo o bagaço usado em ração animal e o leite purificado por decantação. A fécula é então embalada após a secagem.

A legislação brasileira é uma das poucas a distinguir a fécula do amido. Nestas normas, considera-se o amido a fração extraída da parte aérea das plantas e a fécula a fração amilácea extraída das raízes, tubérculos e rizomas (AQUARONE *et al.*, 2001).

Segundo Venturini Filho e Mendes (2003, p.531):

A mandioca se destaca como excelente opção para a fermentação alcoólica por apresentar alto teor de amido, tradição de cultivo em considerável área do Brasil, inclusive com capacidade de expansão em solos menos férteis.

2.1.2 Beiju da Mandioca

A matéria prima para a produção do beiju é a raiz de mandioca ralada e moída. Embora não tenha sido localizada a composição específica de massa ralada e prensada de mandioca usada para fabricação de tiquira, pode-se considerar a composição como semelhante à de outras cultivares de mandioca. Além da massa ralada e prensada de raízes de mandioca, apenas água é adicionada no momento de diluir os beijos e preparar o mosto (VENTURINI FILHO, 2005).

No preparo das bebidas à base de mandioca, a raiz de mandioca, descascada, ralada e prensada, é usada para fazer os beijos que, depois de cozidos, apresentam o amido gelificado. A gelificação do amido facilita a ação das enzimas e deve ser realizada, tanto no processo tradicional como na proposta de um processamento mais

moderno. As enzimas que hidrolisam a fécula (amido) da mandioca e as leveduras que fermentam esses açúcares a etanol são de origem autóctone.

O beiju é uma placa ou cartucho que se consegue com a massa de mandioca ralada e aquecida sobre uma chapa quente (Figura 1). Em seguida, são dispostos em prateleiras forradas com palha de banana ou babaçu onde permanecerão até o desenvolvimento de fungos.



FIGURA 1: *Beiju de Mandioca após 8 dias de incubação apresentado grandes quantidades de micro-organismos.*

2.1.3 Amido

O amido é o produto final do processo fotossintético e constitui reserva de carbono nas plantas. Sua formação ocorre devido à atividade combinatória de algumas enzimas, tanto nas organelas fotossinteticamente ativas, onde o amido é reserva temporária, quanto nos amiloplastos de órgãos de reserva (MENEZES , 1980).

Segundo Bobbio e Bobbio (2003), o amido constitui a mais importante reserva de nutrição de todas as plantas superiores ocorrendo principalmente em sementes, tubérculos, rizomas e bulbos. Ocorre também em algas e, pelo fato de ser facilmente hidrolisado e digerido, é um dos elementos mais importantes da alimentação humana.

O amido é a substância que proporciona de 70 a 80% das calorias consumidas pelos seres humanos. As mais importantes fontes potenciais do amido são

os grãos de cereais (40 a 90% do seu peso seco), legumes (30 a 70% do seu peso seco) e os tubérculos (65 a 85% do seu peso seco). O amido, na natureza, é encontrado como grânulos ou grãos. Estes são relativamente densos ou insolúveis e se hidratam deficientemente em água fria (FENNEMA, 2000).

Para Magro (2005), as matérias amiláceas e feculentas são fermentadas após uma hidrólise, denominada sacarificação, através da qual o amido in fermentescível é transformado em açúcares fermentescíveis.

Conforme Nigam e Singh (1995), o amido pode ser facilmente hidrolisado usando enzimas amilolíticas, sendo que essas enzimas podem ser facilmente produzidas por micro-organismos.

O amido de mandioca tem algumas vantagens em comparação a outros tipos de amidos como, por exemplo, a facilidade de hidrólise (AYERNOR *et al.*, 2002).

2.1.3.1 Gelatinização do amido

O fenômeno de gelatinização ou gelificação do amido é extremamente importante para vários alimentos. Grânulos de amido nativo são insolúveis em água abaixo de sua temperatura de gelificação. Eles expandem um pouco em água fria (10-20%), devido à difusão e absorção de água dentro das regiões amorfas, entretanto, esta expansão é reversível pela secagem (BILIADERIS, 1991).

De acordo com Morrison (1995), nas zonas amorfas os componentes que expandem são amilose e um pouco de amilopectina. Essa expansão é limitada por ser severamente restringida pelas camadas essencialmente contínuas de amilopectina cristalina. Este autor considera que esse grau de expansão seja reversível porque as camadas cristalinas não são perturbadas.

Na presença de água e calor os grânulos de amido expandem-se embebendo água. Com o aquecimento, a temperatura de gelatinização é atingida e uma pasta é formada.

Leonel *et al.* (2002) avaliando as propriedades da pasta de amido de batata e mandioca, avaliadas pelo rápido visco mostraram temperatura de pasta de (64,8⁰C e 66,7⁰C) respectivamente.

2.1.3.2 Estrutura do Amido

O amido é constituído por uma mistura de dois polissacarídeos denominados amilose e amilopectina, em proporções que variam entre os amidos procedentes de diferentes espécies vegetais e, mesmo entre amidos provenientes da mesma espécie, as proporções de amilose e de amilopectina variam de acordo com o grau de maturação das plantas. As proporções de amilose e amilopectina influem na viscosidade e no poder de gelificação do amido (BOBBIO; BOBBIO, 2003).

Continuando a descrição sobre a estrutura do amido, Lehninger (1999) destaca que o amido possui dois tipos de polímeros da glicose, a amilose e a amilopectina. O primeiro consiste em cadeias longas, que acreditava-se serem não ramificadas de unidades de D-glicose unidas por ligações α -1,4. Tais cadeias variam em peso molecular de uns poucos milhares até 500.000. A amilopectina também tem peso molecular alto (até 1 milhão), porém é altamente ramificada. As ligações glicosídicas unindo os resíduos de glicose nas cadeias de amilopectina são α -1,4, mais os pontos de ramificação, que ocorrem entre cada 24 e 30 resíduos, são ligações α -1,6.

Conn e Stumpf (1975) relatam que a amilose, um dos componentes do amido e fécula, é formada por unidades de D-glicose unidas linearmente por ligações α -1,4, possuindo uma extremidade redutora e uma não-redutora.

A amilopectina é um polissacarídeo ramificado, na sua molécula, cadeias mais curtas de glicose unidas por ligações α -1,4 são unidas também entre si por ligações α -1,6.

A amilose apresenta a propriedade de absorver até 25 vezes seu peso em água. A amilopectina, de cada 20 a 30 moléculas de glicose ocorre um ponto de ramificação. Essa característica a torna menos suscetível à ação de algumas enzimas do que a amilose, o que é um fator importante para explicar a ação das enzimas sobre o amido e sua aplicação em processos industriais (CEREDA, 2001).

O amido é um hidratado de carbono, composto por carbono, hidrogênio e oxigênio na proporção de 6:10:5 de forma geral ($C_6H_{10}O_5$). As unidades de glicose estão ligadas entre si pelo C_1 e C_4 através de oxigênio, formando uma ligação glicídica (WHISTER; DANIEL, 1984).

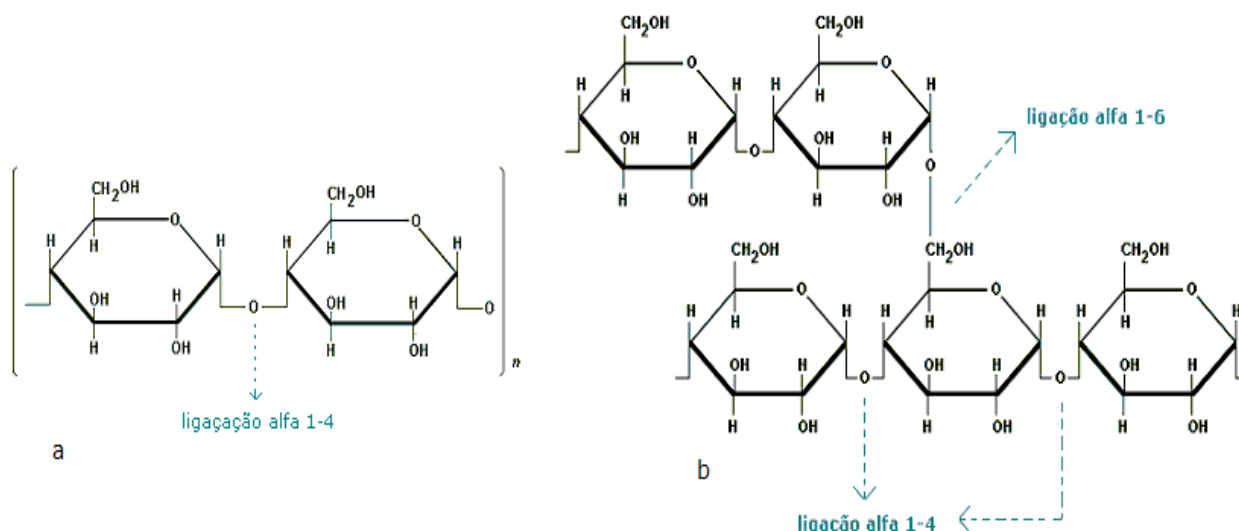


FIGURA 2: Estrutura química da molécula de Amilose (a) e Amilopectina (b).

2.1.3.3 Principais enzimas que agem sobre o amido

Segundo Rosas (2003), as enzimas são substâncias orgânicas específicas compostas por polímeros de aminoácidos, que atuam como catalisadores no metabolismo dos seres vivos.

As enzimas são denominadas de acordo com o substrato sobre o qual atuam, portanto, o termo amilase indica a ação sobre o amido (amilo), que contém dois tipos de polissacarídeos: a amilose (15-20%) e a amilopectina (80-85%) (HARGER *et al.*, 1982).

Aquarone *et al.* (2001) destacam que as enzimas podem ser obtidas de fontes animais (pancreatina, pepsina, renina, catalase), de fontes vegetais (papaína, bromelina, ficina, amilases do malte) ou a partir de micro-organismos.

Para Reed (1975), as enzimas responsáveis pela degradação do amido estão amplamente distribuídas na natureza. Entre elas estão as amilases, que atuam sobre o amido, glicogênio e polissacarídeos para hidrolisar as ligações α -1,4.

As amilases podem ser divididas em três grupos: as α -amilases, as quais rompem as ligações no interior do substrato (endoamilases); as β -amilases, que hidrolisam unidades das extremidades não redutoras do substrato (exoamilases); e as

glucoamilases (amiloglucosidase), as quais liberam unidades de glicose do terminal não-redutor das moléculas do substrato.

Segundo Conn e Stumpf (1975), a α -amilase hidrolisa a cadeia linear da amilose, atacando ao acaso as ligações α -1,4 por toda a cadeia, produzindo uma mistura de maltose e glicose. A β -amilase, ataca a extremidade não-redutora da amilose, resultando em sucessivas unidades de maltose.

A amilopectina também pode ser atacada por α -amilase e β -amilase, mas as ligações α -1,4 próximas das ramificações da amilopectina, e as ligações α -1,6 não são hidrolisadas por essas enzimas. Portanto, um núcleo condensado e ramificado, obtido da amilopectina original - denominado dextrina limite - é o produto dessas enzimas. Outra enzima, a α -1,6 glicosidase irá hidrolisar a amilopectina até uma mistura de glicose e maltose (CONN; STUMPF, 1975).

De acordo com Fujii *et al.* (1988), citados por Leonel e Cabello (2003), a amiloglucosidase é uma enzima sacarificante utilizada para produzir glicose a partir do amido, hidrolisando ligações tipo α -1,4 e α -1,6. A ação da amiloglucosidase é lenta no ataque inicial à amilose, pois sendo uma exoenzima, só atua a partir da extremidade não-redutora e não penetra no interior da estrutura helicoidal da amilose.

A Figura 3 apresenta a ação das enzimas amilolíticas sobre uma molécula de amido.

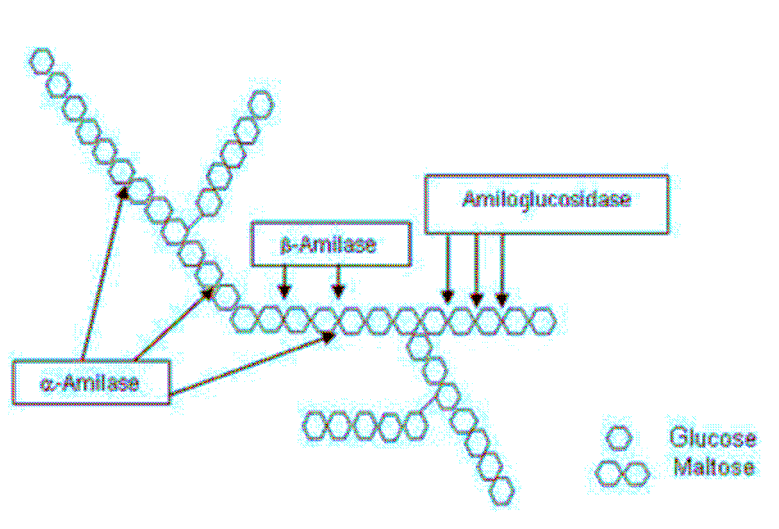


FIGURA 3: Ação das Enzimas Amilolíticas

FONTE: SPIER (2005)

A amiloglicosidase é, em sua maior parte, produzida por espécies de fungos do gênero *Aspergillus* e *Rhizopus*, sendo que dentre essas, a amiloglicosidase de *Aspergillus* é mais termoestável. A amiloglicosidase catalisa eficientemente a hidrólise do amido dentro de uma faixa estreita de temperatura (SANTOS, 2006).

2.2 Processamento da Tiquira

Segundo Venturini Filho (2005), são necessárias 3 (três) etapas principais para produção de álcool a partir do amido: a gelificação do amido com a posterior sacarificação a açúcares, a fermentação alcoólica e a destilação. A sacarificação é feita por bolores e a fermentação por leveduras, ambas da flora autóctone.

- **Pesagem das raízes:** tem objetivo de calcular o pagamento e de controlar o rendimento da produção.
- **Descascamento e lavagem das raízes:** tem por objetivo a retirada da casca marrom apenas, pois a entrecasca possui amido que pode ser convertido em açúcares e álcool. Sendo feito à mão.
- **Ralação:** fragmenta a raíz, expõe o amido e facilita a retirada do excesso de umidade na prensagem.
- **Prensagem:** tem por finalidade a remoção do excesso de umidade. Retira parte da água de constituição da raiz e facilita a confecção dos beijos.
- **Gelificação do amido:** a gelificação permite que a enzima tenha acesso ao amido para transformá-lo em açúcares. A gelificação deve ser feita à temperatura acima de 70°C. Com a gelificação, o grânulo perde a Cristalinidade, sua estrutura se abre, as cadeias em espiral se esticam e a viscosidade aumenta.
- **Sacarificação:** na sacarificação, as ligações do amido são rompidas. Quanto mais completo esse rompimento, maior o rendimento em açúcares. Na conversão, há aumento do rendimento, pois a reação incorpora uma molécula de água por ligação rompida.

- **Preparo do mosto:** o preparo do mosto é feito simplesmente por diluição dos açúcares com água, sem complementações.
- **Fermentação:** ocorre por leveduras autóctones.
- **Destilação:** feita em alambiques de cerâmica ou cobre. Pode ser usado um alcoômetro para estabelecer o teor alcoólico final e o final do processo de destilação.
- **Engarrafamento:** é feito em garrafas de vidro em geral de cor clara. Podem ser usadas garrafas de refrigerante vazias, tipo PET.

2.2.1 Agentes da Fermentação

2.2.1.1 Fungos

Pelczar (1998) define os fungos como sendo organismos eucarióticos não-fotossintéticos, possuindo parede celular, com algumas exceções. Eles obtêm seu alimento por absorção e não possuem clorofila. Enquanto muitos fungos são unicelulares, alguns são multicelulares e macroscópicos.

De acordo com Teixeira *et al.* (1999) os fungos em relação à nutrição, acumulam glicogênio como substâncias de reserva e têm forma de vida diversificada indo desde saprobiontes, comensal, simbioses e parasitas.

Os fungos formam esporos, que são dispersos por corrente de ar. Todos se caracterizam pela nutrição através da absorção e, com exceção das leveduras (que são geralmente unicelulares), a maioria produz um micélio bem desenvolvido constituído de hifas septadas ou cenocíticas. As células móveis não são encontradas em fungos terrestres.

Compreendendo tanto os bolores quanto as leveduras segundo Roitman *et al.* (1988), os fungos são micro-organismos de alta importância na conservação dos alimentos. Considerando-se inicialmente apenas as leveduras, cabe lembrar que a ocorrência de espécies patogênicas em alimentos é praticamente desconhecida, sua

importância residindo muito mais no fato de serem eventuais agentes de deterioração em alimentos nos quais apresentam condições ótimas de desenvolvimento. É interessante observar que, dependendo do tipo de alimento e suas características básicas, uma mesma espécie de levedura pode ser considerada benéfica e essencial ao processo tecnológico, ao passo que, em outro produto, ela pode se constituir em agente de deterioração.

De acordo com o mesmo autor, a visualização do crescimento de bolores é devida ao desenvolvimento do micélio fúngico, constituído de um aglomerado intrincado de hifas, com aspecto variável, de seco e pulverulento a úmido e gelatinoso, compacto ou pouco denso, com aparência cotonosa. O micélio usualmente é incolor, embora em algumas espécies haja produção de pigmentos, conferindo-lhe uma tonalidade vermelha, amarela, castanha, cinza ou preta.

Em muitos bolores, as diferentes colorações das colônias são decorrentes da maciça produção de esporos assexuais, como os conídios e esporangiósporos, resultando em colorações verde, verde-azulada, laranja, castanha, cinza ou preta; particularmente nos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus*, essas colorações são características e auxiliares na identificação de gêneros e espécies.

2.2.1.2 Leveduras Alcoólicas

Conforme Hammond (1995), com o progresso da tecnologia de bebidas, as linhagens de levedura foram sendo selecionadas segundo características desejáveis ao processo e ao produto. A produtividade e a eficiência de fermentação, a tolerância ao etanol e à temperatura, a resistência às altas concentrações de açúcares, a habilidade de flocular e de produzir ou não certos componentes do aroma das bebidas e a propriedade de produzir metabólitos anti-contaminantes (caráter “Killer”) são constantes fontes de interesse.

Não se usa mais qualquer levedura para produzir o álcool industrial ou uma bebida fermentada; não apenas estão excluídos os tipos selvagens, mas também é necessário utilizar uma cepa apropriada.

Venturini Filho e Mendes (2003) definem as leveduras como sendo fungos pertencentes às classes dos Ascomycetos, Basidiomycetos ou Deuteromycetos. Ao

contrário dos bolores, os autores afirmam que as leveduras são normalmente unicelulares, apresentando células de forma oval, elíptica ou arredondada. Possuem parede celular rígida, membrana citoplasmática e as organelas normalmente encontradas nas células superiores, tais como núcleo, mitocôndria, retículo endoplasmático, etc.

De acordo com os mesmos autores, as leveduras multiplicam-se por via sexual e assexual. A via assexual de multiplicação é a mais utilizada pelas leveduras nos processos industriais de fermentação. As leveduras dependem, para o seu desenvolvimento e sobrevivência, de carbono orgânico, principalmente na forma de carboidratos. Quanto ao ambiente, as leveduras se desenvolvem numa ampla faixa de temperatura, sendo que o intervalo ótimo de crescimento situa-se entre 20-30°C. Em relação à variação de pH, os limites estão entre 2,2 - 8,0. Esses micro-organismos apresentam também elevada resistência osmótica.

As leveduras são micro-organismos saprófitas que exigem uma fonte de carbono elaborada – glicose ou outro açúcar – que fornece a energia química e o esqueleto carbônico de suas estruturas celulares, constituídas predominantemente de carbono, oxigênio e hidrogênio (AQUARONE *et al.*, 2001).

Embora as leveduras possam diferir bastante em suas características fisiológicas, aquelas de importância em alimentos têm grandes características em comum. De modo geral, as leveduras requerem menos umidade que a maioria das bactérias e mais umidade que a maioria dos bolores. As leveduras multiplicam-se melhor quando estão em aerobiose, mas os tipos fermentativos multiplicam-se bem também em anaerobiose. Açúcares são as melhores fontes de energia, embora leveduras oxidativas sejam capazes de oxidar ácidos e orgânicos a álcool (FRANCO; LANDGRAF, 2005; NOVAES *et al.*, 1974; LIMA *et al.*, 1975).

A levedura utilizada no processo deve apresentar determinadas características que garantam o rendimento fermentativo. A massa de células para se iniciar a fermentação denomina-se pé-de-cuba, pé-de-fermentação, levedo alcoólico ou fermento, e deverá estar ativa e em quantidade adequada, para que o processo ocorra de modo satisfatório.

2.2.1.3 Leveduras Selvagens

Para Venturini Filho; Mendes (2003), leveduras selvagens são aquelas que são estranhas ao processo de fermentação alcoólica, podendo ser da mesma espécie ou não em relação à levedura de processo. Sua presença no processo fermentativo é resultado de contaminação. Essas leveduras causam queda no rendimento e na produtividade da fermentação, bem como na qualidade do produto final.

2.2.1.4 A Espécie *Saccharomyces cerevisiae*

Segundo Lodder (1970), a *Saccharomyces cerevisiae* é largamente disseminada na natureza, porém, esta espécie é mais frequentemente associada com fermentações industriais, em particular as fermentações para produção de bebidas alcoólicas e etanol carburante. A espécie é também empregada na produção de levedura de panificação.

Em função de sua grande disponibilidade na forma de levedura prensada, essas leveduras são extensivamente empregadas como fonte de obtenção de uma grande variedade de enzimas. É utilizado, também, como material básico para a maioria dos estudos fundamentais sobre genética de leveduras.

As células da *Saccharomyces cerevisiae* possuem geralmente formato elipsóide, sendo que o maior diâmetro das células varia entre 5 e 10 μm e o menor diâmetro varia entre 1 a 7 μm . A média dos volumes celulares é de 29 ou 55 μm^3 para as células haplóides e diplóides, respectivamente, e o tamanho celular aumenta de acordo com a maturação da célula (FELDMANN, 2005).

As colônias de *S. cerevisiae* são de coloração branca ou creme, de aspecto cremoso, possuem reprodução vegetativa por brotamento e podem possuir pseudo-hifas simples, apresentam ascos persistentes contendo quatro ou mais ascósporos, redondos ou ovais (BARNETT *et al.*, 2000).

As leveduras do gênero *Saccharomyces*, que tradicionalmente são utilizadas na produção de etanol, não possuem habilidade de hidrolisar amido (LIU *et al.*, 2004).

Guedes *et al.* (1994), relatam que a *S. cerevisiae* tem rápido crescimento celular, alta tolerância a etanol e uma eficiente produção de etanol, é constituída por 48% de proteínas de qualidade e tem sido associada por séculos à produção de bebidas e alimentos.

2.2.1.5 Fungos Filamentosos

Os fungos filamentosos microscópios são predominantemente pluricelulares, apresentam micélio aéreo, possuem reprodução sexuada e/ou assexuada. Sua estrutura morfológica fundamental é a hifa, que pode ser uni ou multinucleada, septada ou conócítica, sendo que o seu conjunto constitui o que denominamos de micélio. Seus esporos ou conídios, estruturas reprodutivas de origem sexuada ou assexuada respectivamente, são oriundos da especialização de seu micélio em órgãos ou sistemas reprodutivos podendo ser endógeno ou exógeno (LACAZ, 1992).

Conhecidos vulgarmente como bolores ou mofos, os fungos filamentosos elaboram numerosos metabólitos, alguns de grande interesse industrial, tais como: enzimas, alcoóis, ácidos, pigmentos corantes, polissacarídeos, esteróis, substâncias antibióticas (penicilina, notatina, flavicina) e algumas bastantes complexas como a ergotinina (CARVALHO, 1999).

Segundo Neder (1992), os fungos se reproduzem por meio de esporos. Em condições favoráveis, o esporo absorve água, aumenta de tamanho e germina emitindo um tubo germinal, que se alonga por crescimento da extremidade distal e se tornam filamentosos longos que se ramificam. Cada filamento é chamado de hifa.

Ao continuar o crescimento, a hifa pode ser dividida em uma cadeia de células pela formação de paredes transversais ou septos. Esses septos dividem as hifas e células unicelulares e multicelulares. As hifas que são divididas por septos são chamadas de septadas.

Alguns fungos, entretanto, não desenvolvem paredes celulares, formando as hifas não-septadas. Em tais hifas o protoplasma corre livremente através dos filamentos e, neste caso, são chamadas cenocíticas.

Continuando o crescimento, as hifas podem se ramificar diversas vezes e se entrelaçar, formando uma estrutura chamada micélio. A parte do micélio que penetra no substrato, digerindo-o e absorvendo-o, é conhecida como micélio vegetativo; a parte que é responsável pela produção de esporo e usualmente se estende para o ar é chamado micélio reprodutivo.

O micélio reprodutivo e seus esporos variam grandemente nas diferentes espécies de fungos e servem para classificá-los e identificá-los. Como resultado do crescimento, uma colônia filamentosa é formada. O tipo de micélio encontrado na colônia filamentosa é de grande importância para distinguir a classe de fungo (NEDER, 1992).

A estrutura produtora de esporo é chamada esporóforo. Quando a extremidade terminal do esporóforo forma um saco, esse é chamado esporângio e o esporóforo de esporangióforo. Os esporos contidos em tais estruturas são denominados esporangiósporos. Quando estes estão maduros, o esporângio se rompe pela pressão interna ou é desenvolvido por enzimas secretadas, e então os esporangiósporos são libertados (NEDER, 1992).

Quando os esporos não estão contidos dentro de membranas, isto é, nascem livres, o esporóforo é chamado conidióforo. O esporo recebe o nome de conídio. Os conídios variam bastante em tamanho, forma, cor, número de septos, bem como as células dos conidióforos que os originam.

2.2.1.5.1 Fungos do gênero *Aspergillus*

O *Aspergillus niger*, como sugere seu nome, é um fungo filamentoso negro comumente denominado como “mofo negro” (WAINWRIGHT, 1995). De acordo com Prado (2002) o *A. niger* apresenta como características particulares colônias brancas a amarelo pálido, mais rapidamente forma milhares de esporos. Os conídios são esféricos, medem de 3 a 5 μm e tornam-se rugosos ao atingir a maturação. O *A. niger* apresenta hifas finas, septadas e conidióforos com vesículas recobertas por conídios negros.

Este grupo de fungos filamentosos com um grande número de espécies possui características que os fazem micro-organismos ideais para aplicações industriais como: boa capacidade de fermentação e altos níveis de secreção de enzimas (JA'AFARU, 2007).

Kaaij (2007) relata que algumas espécies de *Aspergillus*, tais como, *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus flavus* são patógenos oportunistas para homens e animais. A maioria das infecções sistêmicas em humanos é encontrada em pacientes

imunodeprimidos. Outras espécies, como o *A. niger*, são bem conhecidas por sua utilização na produção de alimentos e na biotecnologia moderna.

Segundo o mesmo autor, o *A. niger* é um fungo comum do solo, observado como um bolor negro em frutas e outros alimentos. Embora esta espécie seja geralmente não patogênica, inalação de grande quantidade de esporos pode levar a doença pulmonar (aspergilose). Ingestão oral de *A. niger* foi considerada como inofensiva pela OMS (Organização Mundial de Saúde), o qual abriu a oportunidade para sua utilização na produção industrial de ácidos, produtos farmacêuticos e de enzimas.

O uso do *A. niger* apresenta algumas vantagens em relação a outros fungos, como facilidade de manipulação, sua habilidade de fermentar uma grande variedade de matérias-primas de baixo custo e produzir rendimentos elevados de bioprodutos.

2.2.1.5.2 Fungos do gênero *Rhizopus*

O prefixo “rhizo” é relacionado às raízes, o sufixo “pus” deve-se aos rizóides da base dos esporangiósporos ou das hifas que são característicos de algumas espécies desse gênero.

O fungo do gênero *Rhizopus* pertence ao filo Eumycophyta. Fungos pertencentes a este gênero são considerados fungos verdadeiros. O corpo desses fungos é formado por numerosos filamentos denominados hifas, formando um emaranhado que se chama micélio. O *Rhizopus spp.* pertence ao grupo dos ficomicetos, desenvolvem-se sobre matéria orgânica úmida, constituindo o bolor com coloração preta. Apresentam micélio ramificado e desorganizado (USA, 2004).

Segundo Carta (1999), estes fungos estão espalhados pelo solo, especialmente em terrenos turfosos ou úmidos, no estrume, na poeira do ar, em alimentos e nos utensílios em condições higiênicas precárias.

De acordo com o mesmo autor, a reprodução efetua-se por germinação de esporos. Os esporos maduros são liberados dos aparelhos esporíferos e disseminados. Um esporo germina e libera um filamento ou hifa que cresce, para dar um novo micélio. Seus esporos são de natureza assexuada.

2.2.2 Fatores que influenciam no crescimento dos fungos

Os fungos apresentam grande capacidade de colonização e exploração de substratos orgânicos vivos em decomposição. Essa capacidade diferenciada de exploração dos substratos está intimamente relacionada com as características ambientais e físicas a que o fungo é exposto, bem como às exigências nutricionais inerentes de cada espécie fúngica, fundamentais para o seu desenvolvimento (SIDRIM; MOREIRA, 1999).

Os fungos necessitam de condições mínimas necessárias para o seu crescimento. Essas condições são os fatores nutricionais e os fatores físicos.

Na produção de amilases por fungos e bactérias, o efeito da fonte de carbono na indução e repressão da enzima é muito importante como fonte de regulação da biossíntese. Amido e substâncias amiláceas têm sido descritos como os substratos mais adequados para a alta produtividade de amilases (CHERRY *et al.*, 2004; SAXENA *et al.*, 2007).

Para produção de biomassa de determinado produto de interesse industrial ou para pesquisa, deve-se exercer um cuidadoso controle nas condições que permitam o desenvolvimento máximo do micro-organismo.

Para o seu desenvolvimento e sobrevivência de acordo com Venturini Filho e Mendes (2003), as leveduras necessitam de carbono, principalmente na forma de carboidratos e estes nas formas de monossacarídeos ou dissacarídeos.

O nitrogênio é utilizado pelo fungo na síntese de ácidos nucléicos, algumas vitaminas, aminoácidos, proteínas e enzimas, sendo considerado como macroelemento de fundamental importância para o seu metabolismo. Naturalmente, o nitrogênio é encontrado no solo na forma de nitrato ou amônio, sendo ambos absorvidos pelo fungo no momento em que são requeridos nos processos metabólicos. Porém, quando o fungo é cultivado em laboratório, se o meio e cultura *in natura* não fornecer uma quantidade necessária desse nutriente, uma suplementação deve ser realizada. As fontes de

nitrogênio podem ser inorgânicas na forma de sais de nitritos, nitratos ou amônio, ou orgânicas na forma de uréia, aminoácidos ou extrato de levedura. A utilização destes compostos depende do tipo de micro-organismo utilizado (PUTZKE; PUTZKE, 2004).

2.3 Hidrólise Enzimática (Sacarificação)

A necessidade de sacarificar os amiláceos, segundo Surmely *et al.* (2003), decorre do fato de que os agentes de fermentação não possuem enzimas amilolíticas.

Na concepção do mesmo autor, a sacarificação é o processo de transformação do amido ou fécula infermentescível em açúcares fermentescíveis. Realiza-se por via química ou biológica. A sacarificação biológica se faz por ação enzimática do malte ou pela ação dos micro-organismos de certos fungos.

Além do amido, as enzimas são os agentes mais importantes nas reações de hidrólise. Aquelas usadas no processo de hidrólise chamadas enzimas amilolíticas são compostos de natureza protéica que atuam como catalisadores biológicos em todas as reações metabólicas energeticamente possíveis e aceleram essas reações por ativação específica (CHAPLIN; BUCKE, 1990).

Atribui-se a Bechner, no século 17, a afirmação de que somente os líquidos açucarados são capazes de entrar em fermentação alcoólica. Ao contrário do que pensavam alguns pesquisadores que o antecederam, para Bechner o álcool se formava durante o processo de fermentação, julgando erradamente, no entanto, a necessidade de ar para causar o fenômeno que ele considerava semelhante à combustão (ROITMAM, *et al.*, 1988).

Carioca e Arora (1984) destacam que a hidrólise do amido pode ser realizada pelas vias químicas ou enzimáticas, sendo o processo enzimático o mais vantajoso. Por esta razão, diferentes micro-organismos com propriedades amilolíticas têm sido estudados. A hidrólise microbiana pode ser feita usando fungos com propriedades amilolíticas.

Embora a hidrólise ácida de biomassa seja eficiente e relativamente barata gera resíduos poluentes e produtos que inibem a fermentação posterior. Por isso, a sacarificação enzimática tem sido objetivo da maior parte dos estudos. O processo enzimático oferece potencial de redução de custos em longo prazo, pois é possível se

atingir rendimentos próximos dos estequiométricos e em condições menos críticas de temperaturas, pressão e agressividade química, além do processo ser menos poluente. No entanto, no estágio do desenvolvimento atual, o processo é ainda economicamente inviável o que justifica o interesse pelo estudo das variáveis que afetam o processo (RABELO, 2007).

Os produtos de conversão enzimática do amido vão da glicose a dextrinas de peso molecular elevado. A matéria-prima para obtenção dos hidrolisados é o amido, polissacarídeo constituído de cadeias retas e ramificadas onde cada molécula é formada de várias centenas de unidades de glicose, ligadas entre si (SURMELY *et al.*, 2003).

A hidrólise do amido pode ser realizada através do uso de enzimas, tais como a α -amilase e a amiloglicosidase (AMG). A primeira atua no interior da cadeia de amido, quebrando-a em oligossacarídeos de menor peso molecular. A amiloglicosidase, por sua vez, atua nos extremos da molécula, liberando unidades sucessivas de glicose (TROVATI; GIORDANO).

A excreção de enzimas amilolíticas, traz como vantagem a redução de custo, permitindo que as etapas de sacarificação (hidrólise do amido em glicose) e fermentação sejam realizadas concomitantemente, melhorando a eficiência de conversão do amido (TUBB, 1986).

2.4 Fermentação

A fermentação é uma ferramenta muito utilizada nos processos industriais e apresenta importância crescente em diversos setores da economia. Muitas empresas por todo o mundo fabricam produtos obtidos através de processos fermentativos, tais como: ácidos orgânicos, aminoácidos, vitaminas, biopolímeros, solventes, enzimas, bebidas alcoólicas, alimentos, entre outros (BORZANI *et al.*, 2001)

A fermentação alcoólica é o processo bioquímico, que ocorre no citoplasma da levedura alcoólica, responsável pela transformação de açúcar em álcool etílico. Esse processo bioquímico é realizado por mais de uma dezena de enzimas, e pode ser considerada como a oxidação anaeróbica parcial, da glicose, por ação de leveduras, com a produção final de álcool etílico e anidrido carbônico, além de outros produtos

secundários. É um processo de grande importância, no qual são obtidos todos os alcoóis industriais e todas as bebidas alcoólicas, destiladas e não destiladas e, como produto secundário, o gás carbônico. É ainda utilizado na produção de leveduras de panificação e na obtenção de leveduras prensadas.

Alves (2000) descreve que a fermentação pode ser definida como todos os processos no qual micro-organismos capitalizam a conversão de uma dada substância num determinado produto com aplicação direta de leveduras em meios naturais ou sintéticos.

A via fermentativa é a maneira mais importante para a produção de álcool etílico no Brasil. Mesmo que se venha a ter disponibilidade de derivados de petróleo que permitam a produção de álcool de síntese, a via fermentativa ainda será de grande importância para a produção de álcool potável, sob a forma de aguardentes (AQUARONE *et al.*, 2001).

Os primeiros estudos envolvendo o mecanismo da fermentação alcoólica relacionavam-se apenas à formação dos produtos inicial e final. Entretanto, o primeiro a efetuar um estudo quantitativo da fermentação alcoólica foi provavelmente Lavoisier, em 1789, seguido de Gay Lussac, que formulou a equação que julgava representar o fenômeno químico da fermentação alcoólica. Obteve, a partir de 45 partes de glicose, 23 partes de álcool e 22 partes de CO₂ (gás carbônico). Coube a Pasteur, a partir de 1857, a explicação clara sobre a natureza da fermentação alcoólica, atribuindo-se a seres vivos, as leveduras, como agentes causais (ROITMAN *et al.*, 1988).

Louis Pasteur mostrou que a fermentação é diretamente provocada pelo processo vital de pequeninos organismos. É possível controlar os processos de fermentação numa forma científica exata pelo entendimento da atividade dos micro-organismos e pelo reconhecimento de que diversas leveduras, por exemplo, atuam diferentemente e de que as condições do meio afetam de maneira básica a ação de uma mesma cepa (SHREVE; BRINK JR., 2008).

Os mesmos autores relatam que o emprego de micro-organismos para converter uma substância em outra é uma ciência assiduamente estudada e aplicada de maneira enérgica. Embora a fermentação de frutos até álcool seja conhecida de culturas primitivas e a fabricação de diversas bebidas de frutos e de cereais seja bem conhecida há vários séculos, somente a geração passada veio reconhecer a ampla aplicação deste procedimento. Atualmente os cientistas estão dirigindo os processos vitais dos fermentos, das bactérias e dos fungos para a produção de substâncias químicas.

Na fermentação alcoólica de açúcares, por ação de leveduras, os principais produtos obtidos em proporções equimolares são o etanol e o dióxido de carbono (Figura 4). Esse mecanismo foi quantificado pela primeira vez por Gay-Lussac, onde 100Kg de glicose rendem 51,1Kg de etanol e 48,9Kg de dióxido de carbono. O rendimento teórico de 51,1% em massa é conhecido como coeficiente de Gay-Lussac e é o dado básico na eficiência de conversão (JACKMAN, 1991).

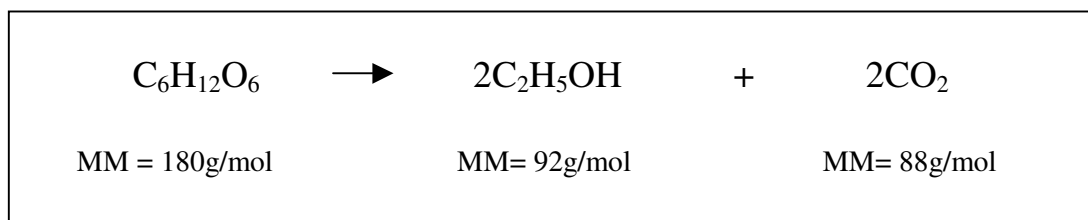


FIGURA 4: Conversão estequiométrica da glicose a etanol e dióxido de carbono.

De acordo com Assêncio (2002) as reações realizadas pelos micro-organismos vivos são, na sua grande maioria, catalisadas enzimaticamente, tornando a velocidade das mesmas compatíveis com as exigências metabólicas. As leveduras produzem as invertases que catalisam a hidrólise da sacarose até glicose e frutose, resultando em mistura equimolecular destes açúcares que são absorvidos pelas células.

Roitman *et al.* (1998) relatam que para o bom desempenho de uma fermentação, deve-se estar atento aos fatores que podem influenciar o rendimento, o que se inicia, desde o preparo do inóculo, para que a fermentação se desenvolva como o mínimo de risco e com a cultura-mãe mais homogênea possível, até a etapa final de recuperação do produto.

2.5 Destilação

Segundo Venturini Filho e Mendes (2003, p.548):

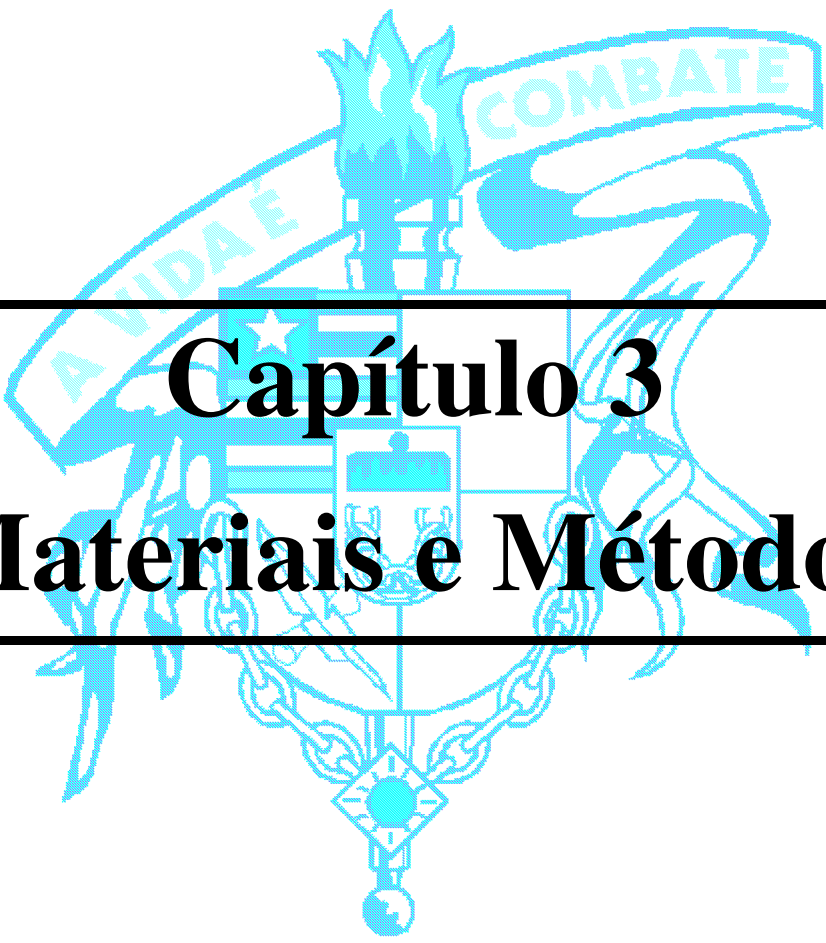
A destilação é um processo de separação de componentes de uma mistura que está baseado na volatilidade de cada um desses componentes, numa dada temperatura e pressão. Na destilação, a mistura é aquecida até a ebulição, sendo que os vapores são resfriados até sua condensação. Se a mistura é bem heterogênea, composta por dois líquidos imiscíveis, o destilado será constituído pelo líquido mais volátil.

De acordo com o mesmo autor, no processo e fabricação de álcool a partir da mandioca, o líquido a ser destilado é o mosto fermentado ou vinho. Esta mistura é composta por componentes que coexistem na fase gasosa, líquida e sólida. O principal componente gasoso é o CO₂ formado na fermentação alcoólica do mosto. A fase líquida, mais importante em termos quantitativos, é constituída por água (88-93%), etanol (7-12%) e outros constituintes secundários, representados quimicamente por aldeídos, ácidos orgânicos, ésteres, alcoóis superiores, glicerol, furfural, etc; na fase sólida encontram-se os sólidos insolúveis, constituídos por células de leveduras e bactérias, bagacilho, etc. e os sólidos insolúveis ou extrato de vinho, representados pelos sais minerais, açúcares não fermentados, açúcares infermentescíveis, dentre outros.

De acordo com Faria *et al.* (2003), a destilação para obtenção de aguardente deve ser fracionada em três partes distintas para retirada de compostos indesejáveis:

- Cabeça: é a primeira fração destilada e contém a maior proporção de compostos mais voláteis, devendo ser separada do produto final;
- Coração: é a segunda fração. Trata-se da aguardente como tal;
- Cauda: é a última fração e, contém como a cabeça, elementos menos voláteis e compostos indesejáveis, devendo ser separada do produto final.

Lopes (1987) destaca que quimicamente o álcool etílico hidratado não apresenta diferença quanto às matérias-primas utilizadas como cana-de-açúcar, cereais, mandioca e batata-doce. As diferenças estão restritas às impurezas que acompanham o álcool, que são características de cada matéria-prima e o grau de purificação pelo qual passou o produto.



Capítulo 3

Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos deste trabalho foram realizados no laboratório de Micologia (Núcleo de Doenças Endêmicas e Parasitárias) localizado no UNICEUMA e nas instalações do programa de pós-graduação em Química Analítica, LPQIA (Laboratório de Pesquisa em Química Inorgânica Aplicada) da Universidade Federal do Maranhão.

3.1 Coleta

As amostras de beijos mofados foram adquiridas diretamente de alambiques do interior do Estado, Humberto de Campos e Boiada (Povoado próximo de Barreirinhas), identificadas, ambientadas (em sacos plásticos) e conduzidas até o Laboratório de Micologia (Núcleo de Doenças endêmicas e parasitárias), UNICEUMA.

3.2 Isolamento dos micro-organismos

Foram retirados pedaços dos beijos (vários pedaços do beiju tentando-se obter uma máxima uniformidade, sendo selecionado também por colorações diferentes) e triturados para posterior pesagem. Em seguida, 1g da farinha foi dissolvida em 150 ml de água destilada em um Erlenmeyer. A suspensão foi deixada em agitação constante por 15 minutos, num agitador magnético. A seguir, procedeu-se 5 diluições, (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}) em tubos de ensaio previamente estéreis (121°C por 15 minutos em autoclave) contendo água destilada (Figura 5).

Retirou-se 300 μl das diluições e semeou-se em placas de Petri contendo diferentes meios de cultura: Potato Dextrose Ágar (PDA), Saboroud Dextrose Ágar

(SDA) e Extrato Malte solidificado e estéril (121°C por 15 minutos em autoclave) e posteriormente incubadas à temperatura de 30°C por 3-4 dias, para se obter o melhor crescimento.

Os fungos crescidos foram isolados em tubos de ensaio contendo 10ml de meio SDA. Após o crescimento das colônias, esporos das mesmas foram utilizados para a realização da técnica de microcultivo para identificação dos gêneros e espécies filamentosas (LACAZ *et al.*, 2002; BARNETT; HUNTER, 1972).

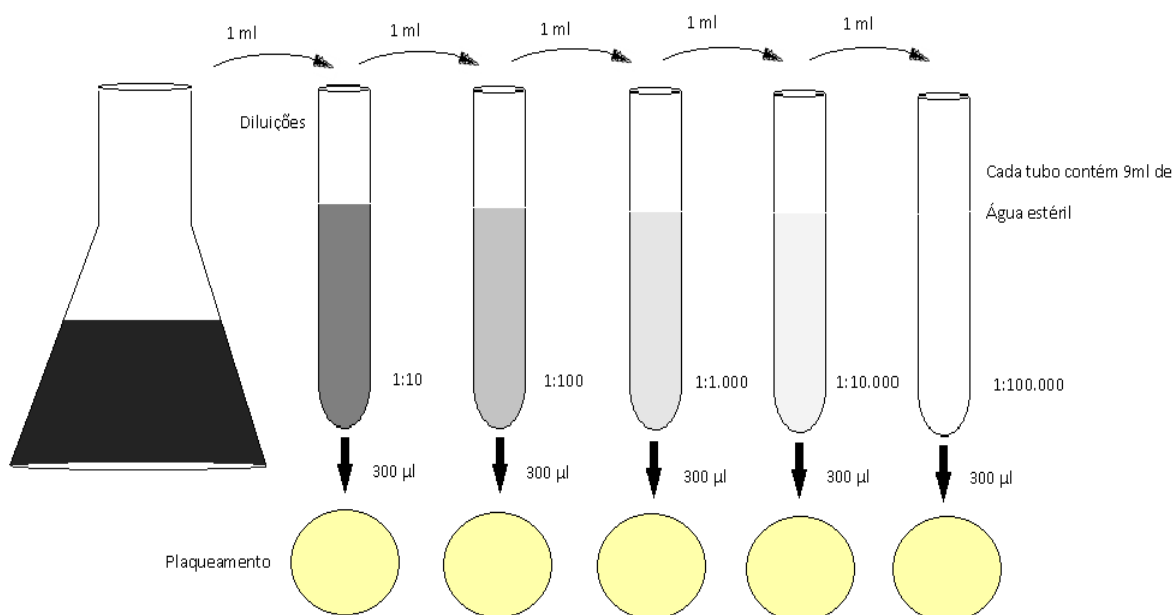


FIGURA 5: *Etapas da diluição seriada do beiju de mandioca para posterior semeadura em placas de Petri em diferentes meios de cultura.*

3.3 Identificação dos micro-organismos

A identificação de gêneros e/ou espécies filamentosas foi realizada por características macroscópicas (textura, topografia e pigmento do verso e reverso da colônia) e microscópicas. As características microscópicas foram realizadas através do microscópio óptico, seguindo as classificações de LACAZ *et al.*, 2002; BARNETT; HUNTER, 1972; SIDRIM; MOREIRA, 1999.

Para análise macroscópica, os fungos isolados foram inoculados por ponto central em placas de Petri contendo meio SDA.

A análise microscópica foi realizada pela técnica de microcultivo em lamínulas (Figura 6), uma adaptação da técnica tradicional de microcultivo em lâminas (LACAZ *et al.*, 2002), com relação a uso de material alternativo (lâminas, lamínulas, algodão e canudos em forma de “V” para suporte das lâminas) e quantidade de meio de cultivo empregada.

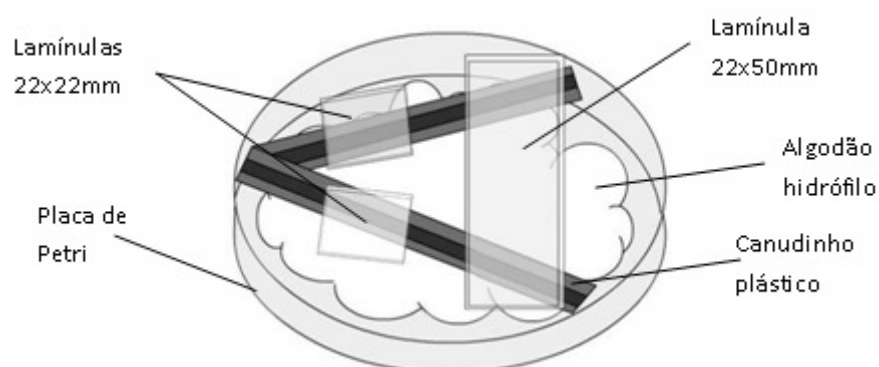


FIGURA 6: *Preparo da técnica adaptada de microcultivo*

3.4 Microcultivo

Para a verificação das características morfológicas das linhagens por microcultivo, foram preparadas placas contendo uma fina camada de meio SDA. Após autoclavadas a 121°C por 15 minutos, o meio foi cortado em quadrinhos de 1x1 cm, e com uma pinça estéril foram transferidos para a lâmina sobre o algodão contido na placa previamente esterilizada (Figura 7). Pequenas porções do micélio da cultura de *R. oryzae*, *A.niger* e *A.flavus* (separadamente) foram semeadas nas bordas do meio de cultura em forma de quadrado, com o auxílio de uma alça de níquel-cromo e o meio coberto com a lamínula estéril. O algodão no fundo da placa foi umedecido com água estéril. As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 4 dias.



FIGURA 7: *Placas de microcultivo após quatro dias de incubação a 30°C.*

Após a incubação, a lamínula foi retirada, o meio descartado e a lâmina corada com azul de algodão lactofenol (Composição: 20ml de ácido láctico; 20g de fenol; 20ml de glicerina; 20ml de água destilada e 0,05g de azul de algodão). As lamínulas foram usadas para cobrir o crescimento das culturas e depois fixadas com esmalte, como mostra a Figura 8.

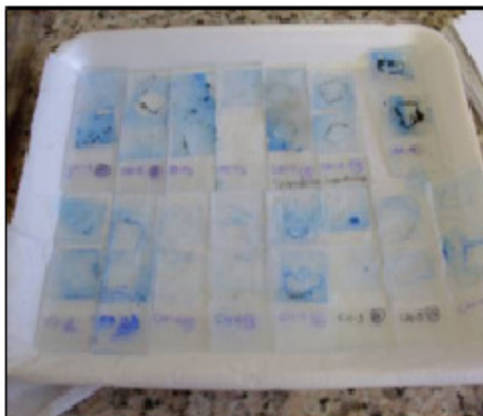


FIGURA 8: *Lâminas prontas para visualização ao microscópio óptico.*

3.5 Conservação das cepas

O método utilizado para conservação das cepas foi repicagem em SDA. O meio foi preparado diluindo-o em água destilada. O meio foi distribuído em tubos de 20ml a razão de 10ml por tubo, autoclavado a 121°C por 15 minutos. Após a

esterilização, o meio foi solidificado dentro de tubos em posição inclinada conforme mostra a Figura 9. Os tubos inoculados foram incubados a temperatura de 30°C por 4 dias (*Rhizopus*, *Aspergillus flavus* e *niger*) e posteriormente conservados a 4°C por 3 meses.

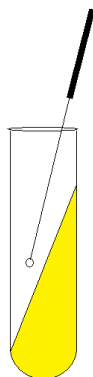


FIGURA 9: Ilustração de tubo de ensaio contendo meio SDA inclinado para repicagem das espécies.

3.6 Preparo das soluções de esporos de *Aspergillus niger* e *flavus*

Os esporos dos fungos do gênero *Aspergillus* foram produzidos em placas de Petri estéreis contendo o meio SDA. O meio foi esterilizado a 121°C durante 15 minutos. Depois de resfriado (45-55°C) o meio foi inoculado em superfície a partir de uma cepa repicada, incubada por 4 dias à temperatura de 30°C até completa esporulação conforme Socool (1992); Costa (1996); Prado (2002).

Os esporos foram recuperados da superfície do meio utilizando-se 10ml de água destilada estéril. Depois de adicionada a solução sobre os esporos, com a ajuda de uma espátula estéril foi realizada a raspagem destes esporos. A suspensão obtida foi conservada a 4°C por até 30 dias.

3.7 Preparo das soluções de esporos de *Rhizopus*

Após a distribuição e solidificação do SDA esterilizado em placas de Petri previamente esterilizadas, procedeu-se a semeadura das cepas nas placas que posteriormente foram incubadas à temperatura de 30°C por 4 dias.

Após esse período, a biomassa de fungo formada (micélio) na superfície do meio contido na placa foi totalmente retirada com auxílio de uma alça de platina, adicionando-as em tubos contendo 20 ml de água deionizada estéril e 0,2 % de tween 80, que foram agitados por 15 minutos.

3.8 Contagem de esporos de *Aspergillus* e *Rhizopus*

A concentração de esporos na suspensão obtida foi calculada pela contagem em microscópio usando câmara de Neubauer. De acordo com Vieira (2000) a câmara de Neubauer consiste em uma lâmina de microscopia, bem mais alta do que uma lâmina normal, onde existe uma câmara gravada de vidro. Ao lado da câmara existem dois suportes que mantêm uma lamínula especial de quartzo exatamente a 10⁻¹ mm acima do chão da câmara. Assim, quando se coloca uma solução na câmara e se cobre a mesma com a lamínula, a profundidade de solução é conhecida.

Para contagem, foram preparadas diluições sucessivas da suspensão de esporos e adicionada sobre a Câmara de Neubauer, com uma pipeta Pasteur. Foram contados todos os esporos presentes nos quadrículos ímpares, conforme a Figura 10. A contagem foi realizada em triplicata para cada diluição preparada (SPIER, 2005).

Os cálculos são mostrados no Anexo 2.

O resultado foi obtido usando a equação (1) e expresso em números de esporos por ml de suspensão.

$$N = \frac{n_e \cdot F}{n_q \cdot v_q}$$

Onde:

F = fator de diluição (inverso da diluição)

N = número de esporos por ml de suspensão (esporos/ml)

n_e = número total de esporos contados

n_q = número de quadriculos contados

v_q = volume do quadriculo: 4×10^{-6}

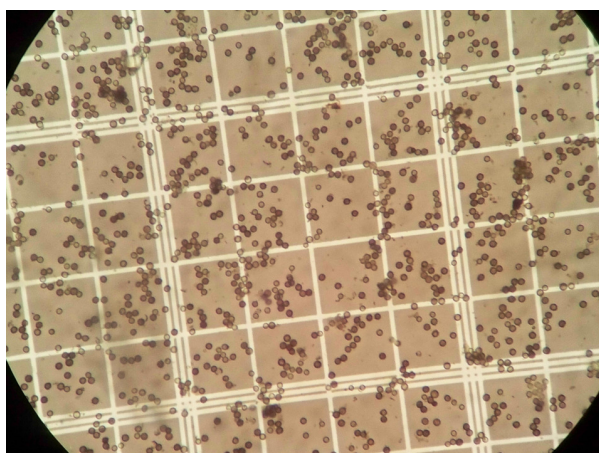


FIGURA 10: *Contagem de esporos em câmara de Neubauer.*

A Figura 11 apresenta as etapas de preparo do beiju de mandioca para identificação de micro-organismos.

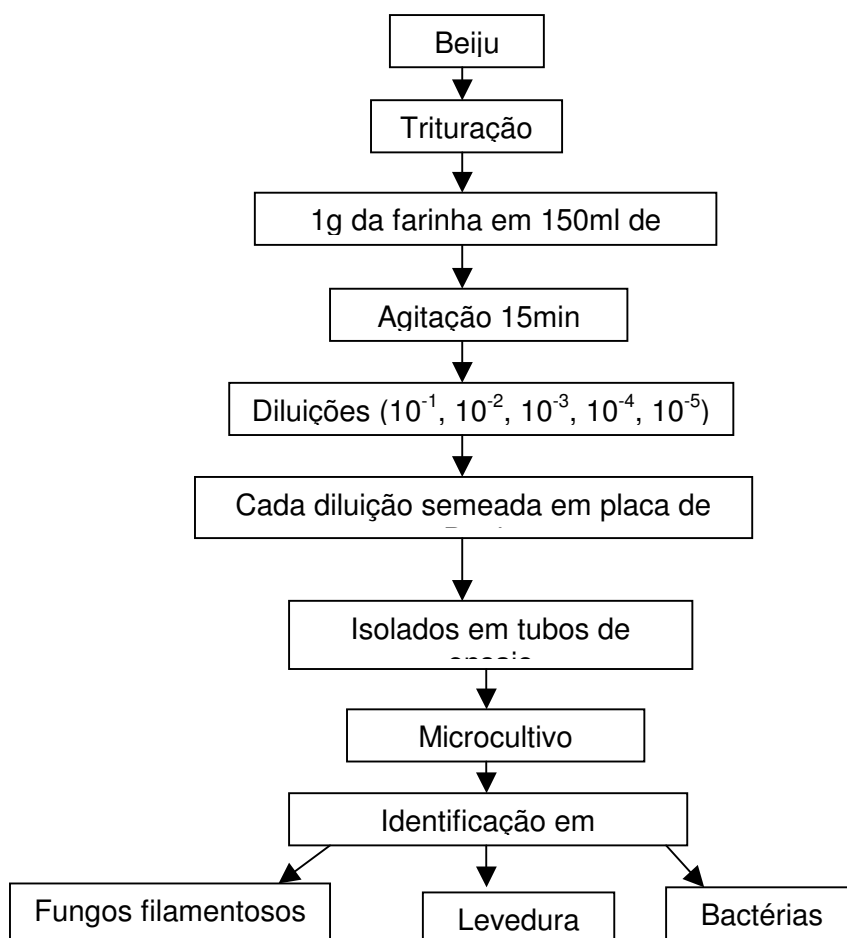


FIGURA 11: *Fluxograma do processo de isolamento e identificação dos micro-organismos encontrados no beiju de mandioca.*

3.9 Sacarificação

A sacarificação foi conduzida em frasco balão de fundo chato de 250ml sob repouso contendo 120ml de solução de fécula de mandioca (Figura 12). Este permaneceu em repouso em estufa, a 30°C durante 72 e 192 horas, sendo retirada alíquotas em intervalos de 12h para as devidas análises.

Utilizou-se uma concentração de 5% de fécula de mandioca comercial da marca Amafil e uma solução a 10% de KNO₃. A solução foi esterilizada a 121°C por 15 minutos para ocorrer a gelatinização do amido. As inoculações das sacarificações para

obtenção de glicose foram feitas utilizando-se uma solução de esporos na concentração de $5,5 \times 10^7$ esporos/g de amido, reproduzindo a concentração ótima obtida por SPIER (2005).

Após a gelatinização, adicionou-se $5,5 \times 10^7$ esporos/g fécula - fungo filamentoso (Agente Sacarificante).



FIGURA 12: *Sacarificação em frasco (balão).*

3.11 Análise do Substrato Fermentado

3.11.1 Sacarificação

Retirou-se 5 ml de amostra a qual foi misturada a 50 ml de água deionizada. Colocou-se sob agitação contínua durante 30 minutos. Em seguida foi filtrada para a remoção dos sólidos obtendo-se um extrato claro. O extrato obtido foi Centrifugado a 3000 rpm durante 15 minutos e o sobrenadante foi utilizado para determinar os açúcares redutores e consumo do amido.

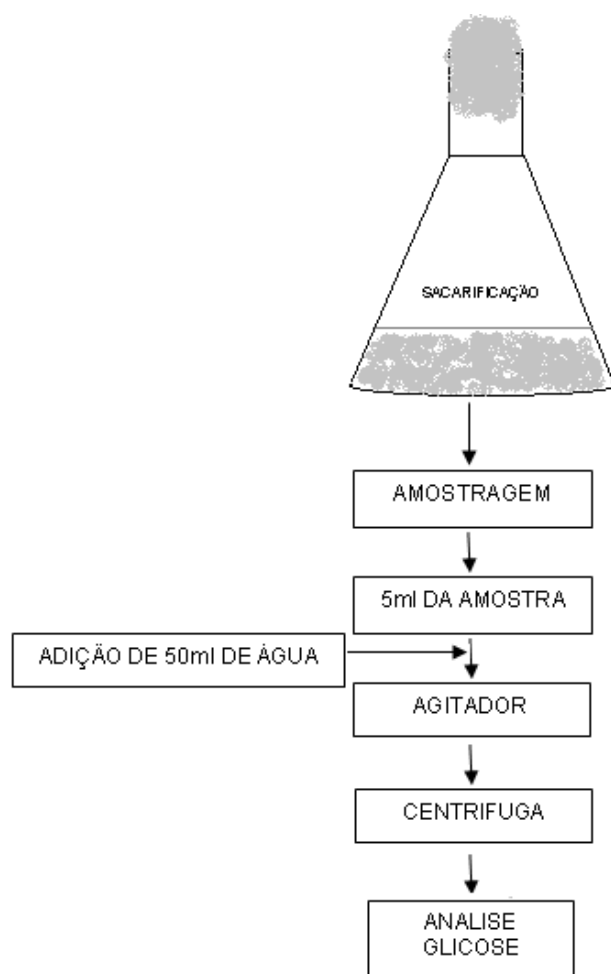


FIGURA 13: *Análise do substrato.*

3.11.2 Determinação de glicose

A determinação de açúcares redutores foi realizada pelo método espectrofotométrico de *Somogyi-Nelson* (NELSON, 1994; SOMOGYI, 1945). Este método baseia-se na redução estequiométrica do Cu^{2+} a Cu^{+1} , com formação de óxido cuproso (Cu_2O), o qual forma um complexo corado como o agente cromogênico, enquanto o açúcar é oxidado a ácido orgânico. O Cu^{+1} é, então, complexado com o reativo de Nelson (arsenomolibdato) que tem um cromóforo, produzindo uma coloração azul cuja intensidade é proporcional a quantidade de açúcares redutores existentes.

Pipetou-se 1,0ml do material neutralizado com NaOH 1M e filtrou-se, transferindo-se para tubo de ensaio e acrescentando-se 1,0ml do reativo de Somogyi. Levou-se ao banho-maria fervente por 10 min. Foi retirado do banho e resfriou-se em água corrente. Acrescentou-se 1,0ml do reativo de Nelson e 7,0ml de água, agitou-se e fez-se a leitura no espectrofotômetro a 535nm.

O método utilizado para análise de glicose é eficiente em comparação a trabalhos já publicados utilizando o método como padrão. O maior problema encontrado é a necessidade de grandes diluições.

Utilizando os métodos Somogyi-Nelson (1945) e cromatografia líquida para quantificação de glicose, Souza (2005) mostrou que o coeficiente de correlação (R^2) foi 0,9231 indicando que a percentagem da variação explicada pelo método foi de 92,31% para os valores de glicose.

Determinando os teores de açúcares totais em alimentos por comparação entre o método colorimétrico e o titulométrico (Somogyi-Nelson; Lane-Eynon; Fenol-Sulfúrico), Demiate *et al.* (2002) chegaram à conclusão que tanto as amostras de concentrações conhecidas quanto em amostras de sucos de maçã e refrigerantes, os métodos utilizados não apresentaram diferença significativa ao nível de 1% de significância. Portanto, qualquer dos métodos avaliados pode ser usado na quantificação de açúcares redutores e totais em alimentos, com a obtenção de resultados confiáveis e seguros.

A Figura 14 demonstra diferentes colorações para diferentes quantidades de glicose produzidas (seta no sentido da ordem crescente de glicose na mostra). A preparação que há uma maior quantidade de glicose na amostra, utilizando-se diluições idênticas para os devidos intervalos de tempo, nota-se colorações mais intensas, sendo constatado no espectrofotômetro que quanto mais intensa a coloração, maior a quantidade de glicose produzida.

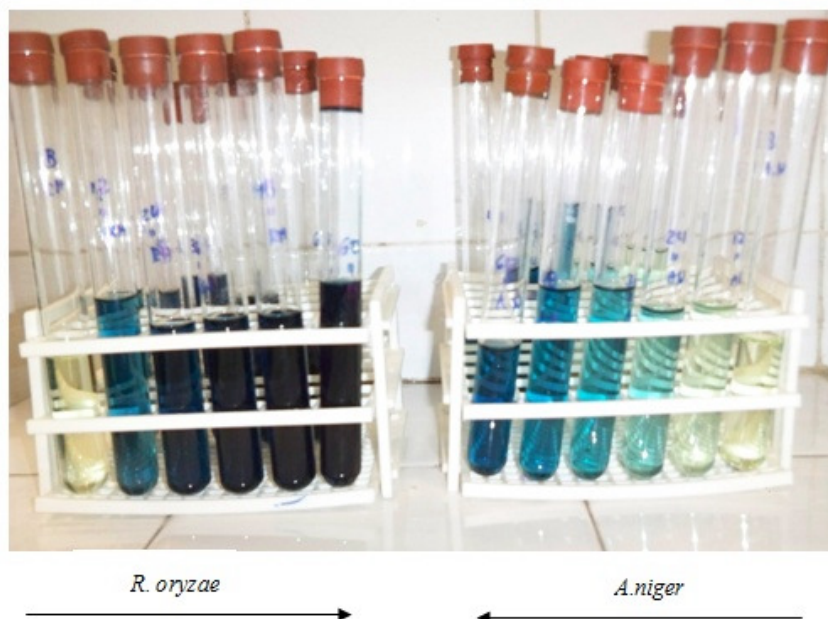


FIGURA 14: *Teste Somogyi-Nelson para análise de glicose produzida.*

3.11.2.1 Curva analítica padrão de glicose

Pesou-se 1,0g de glicose P.A anidro e completou-se com água a 100,0 ml. Retirou-se do balão: 0,2 - 0,4 - 0,6 - 0,8 e 1,0 ml e transferiu-se para balão volumétrico de 100,0 ml, para se obter soluções a 2, 4, 6, 8, 10 mg/100ml. Retirou-se de cada balão volumétrico 1,0ml da solução de glicose e transferiu-se para tubos de ensaio, acrescentando 1,0ml do reativo de Somogyi. Levou-se ao banho-maria fervente durante 10min tampando os tubos com rolhas. Retirou-se do banho e resfriou-se com água corrente. Acrescentou-se 1,0ml do reativo de Nelson e 7,0ml de água destilada. Agitou-se os tubos e fez-se a leitura a 535nm.

As curvas padrão foram construídas em gráficos cartesianos e as equações da reta que correlaciona as medidas da absorbância com as concentrações conhecidas de glicose foram determinadas.

O preparo das soluções do reativo de Somogyi e Nelson são mostrados no Anexo 3.

A Figura 15 mostra a curva de calibração obtida para concentrações conhecidas de glicose em função das absorbâncias e também a equação da reta que foi

utilizada para determinar as concentrações de açúcares livres presentes nos experimentos.

A equação da reta da curva foi a seguinte: $y = 0,037X + 0,0468$ ($R^2 = 0,9954$), esta equação da reta foi utilizada para o processo de sacarificação, para quantificar a concentração de glicose no processo.

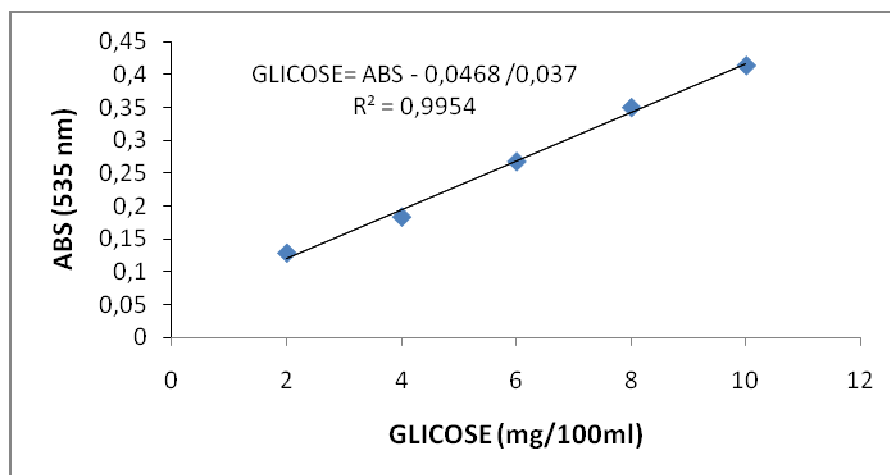


FIGURA 15: *Curva Analítica Padrão de Glicose*

3.12 Rendimento do processo de sacarificação

O rendimento do processo de sacarificação foi definido como a porcentagem de amido que foi removida da solução e transformada em glicose. Considerando um fator de conversão de 90% (a quantidade de amido na fécula de mandioca comercial AMAFIL corresponde a 90%), assumiu-se que “100g de amido produzem 100g de glicose” (CABELLO e SAITO 2006). O resultado foi obtido utilizando a equação 2:

$$\text{Rendimento\%} = \frac{\text{conc. Glicose no hirolisado}}{\text{conc. do amido} \times 0,9} \times 100$$



Capítulo 4

Resultados e Discussão

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento e identificação dos Micro-organismos

Os micro-organismos encontrados nos beijos de mandioca provenientes de alambiques do interior do Estado foram purificados e identificados, dos quais predominaram três espécies de fungos filamentosos (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Rhizopus oryzae*), muitas bactérias (as quais não foram identificadas) e uma levedura (*Saccharomyces cerevisiae*).

A Figura 16 apresenta o crescimento das culturas destes fungos em diferentes meios de cultura a 30°C. O tempo total de monitoramento do crescimento foi de 48h durante os quais pode-se observar: coloração, textura, topografia e mudança de cor do meio de cultura, características estas muito importantes para identificação macroscópicas destes fungos.

Em todos os três casos o micélio cresceu rapidamente em 24 horas no meio Saboroud, apresentando crescimento moderado em PDA e Ex. Malte, sendo a espécie *R. oryzae* a que mostrou maior crescimento, atingindo completamente o diâmetro da placa de Petri em menor tempo.

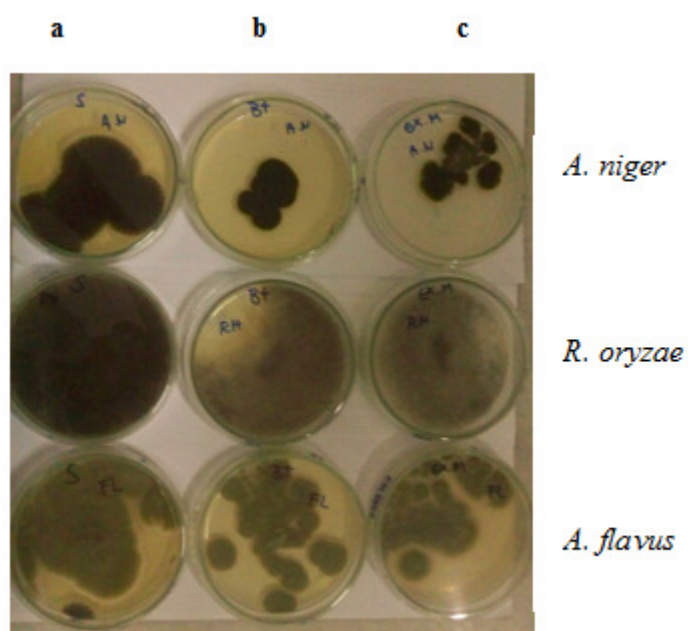


FIGURA 16: *Crescimento das cepas de A. niger, R. oryzae e A. flavus por 48h em diferentes meios de cultura, a) SDA, b)PDA e c)Ex.Malte a 30°C.*

As chaves de identificação consultadas foram as de LACAZ *et al.*, 2002; BARNETT; HUNTER, 1972; SIDRIM; MOREIRA, 1999.

Todas as linhagens em estudo apresentaram desenvolvimento na temperatura de 30°C dentro de 24 horas. Spier (2005), trabalhando com cepas de *Aspergillus e Rhizopus* obteve como temperatura ótima de crescimento 30°C para todos os ensaios. Ao estudar a influência de temperatura para o crescimento do *Rhizopus Oryzae* LPB 627, Soccol (1992) obteve a mais rápida velocidade de crescimento à temperatura de 30°C após testar temperaturas de 22°, 25°, 30°, 36° e 41°C.

Em função deste resultado obtido, ficou definido que a temperatura de incubação das linhagens de 30°C seria a utilizada nos experimentos posteriores.

A Figura 17 mostra a cultura de *Aspergillus niger*, produtor de enzimas observado em microscópio óptico.

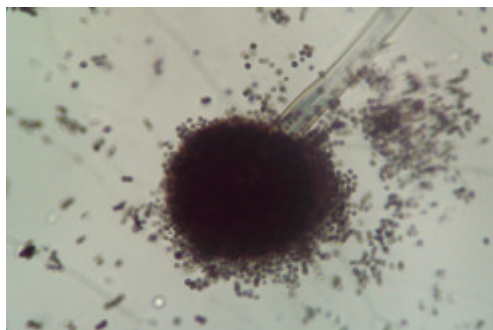


FIGURA 17: *Imagem do fungo Aspergillus niger obtida por microcultivo em SDA visto ao microscópio óptico (aumento 400X).*

As Figuras 18 e 19 mostram a cultura de *R. oryzae* e *A. flavus* respectivamente, também produtoras de enzimas amilolíticas, observadas em microscópio óptico:

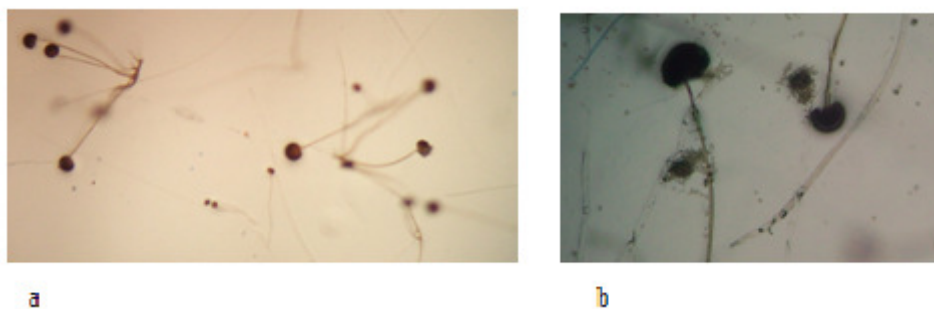


FIGURA 17: Imagem do fungo *Rhizopus oryzae* obtida por microcultivo em SDA visto ao microscópio óptico (aumento 100x a e 400x b).

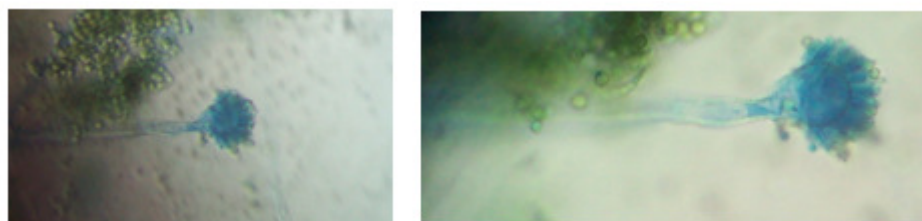


FIGURA 18: Imagem do fungo *Aspergillus flavus* obtida por microcultivo em PDA visto ao microscópio óptico (aumento 400X).

De acordo com os estudos de Park *et al.* (1982), a flora natural de beijos coletados em 3 diferentes unidades de fabricação de tiquira no maranhão próximas da capital e encontraram *Aspergillus niger* e *Paecilomyces sp.* como espécies predominantes, sendo também encontrada quantidade moderada de *Rhizopus sp.* e *Neurospora*. Jalavicharana (1950), estudando a microflora do ragi (arroz), verificou a presença de espécies *Aspergillus*, *Mucor*, *Rhizopus* e *Penicillium*, sendo predominante o *Aspergillus flavus*.

Os resultados obtidos por estes autores foram semelhantes aos encontrados nesta pesquisa. Isto seria esperado, pois entende-se que fungos espalham-se na natureza através de várias vias de dispersão como o ar atmosférico, água, insetos, homem e outros animais. Porém, em cada localidade será encontrado linhagens e concentrações diferentes de fungos.

Testes realizados no laboratório de microbiologia do HUPD (Hospital Universitário Presidente Dutra), para quinze amostragens de possíveis leveduras inoculadas em tubos inclinados, mostraram a presença de quatorze bactérias e uma levedura, a qual foi identificada, apresentando como resultado a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 20).

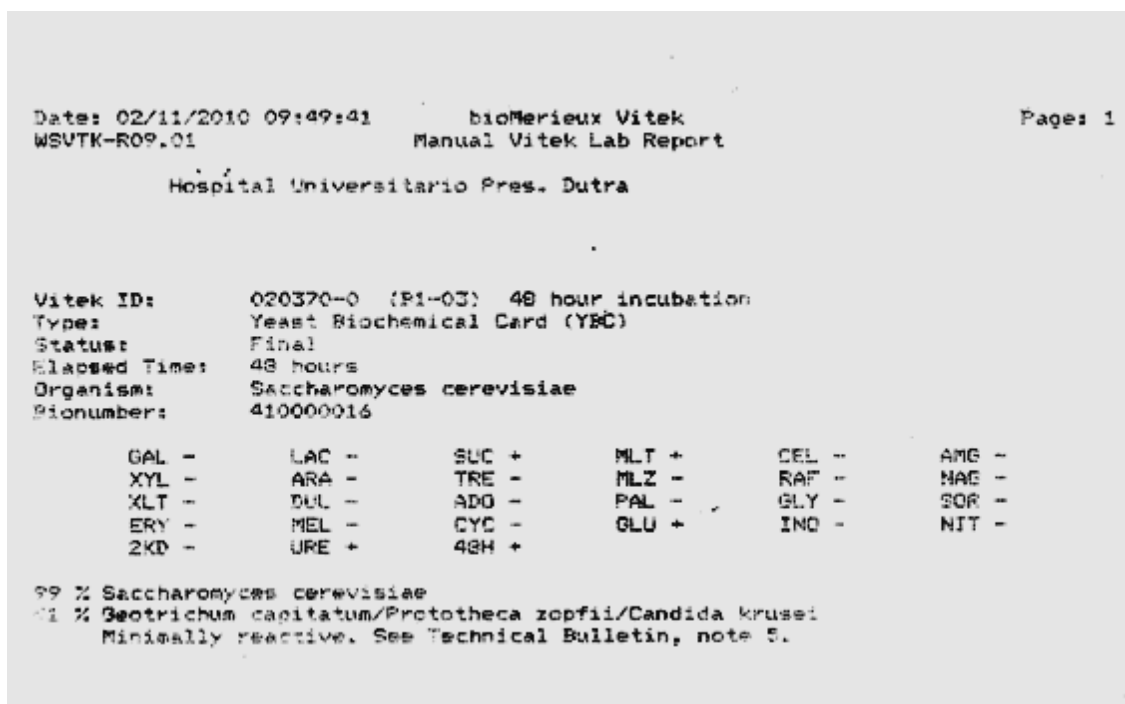


FIGURA 20: Resultado da identificação de levedura, sendo o laudo positivo para a espécie *Saccharomyces cerevisiae* (99%).

4.2 Sacarificação

A sacarificação em frascos (balão) foi realizada com o intuito de avaliar quais as cepas dos fungos filamentosos pré-selecionadas a partir do crescimento em placas são maiores produtoras de enzimas capazes de converter o amido em glicose, e definir a cepa padrão para a continuidade deste trabalho de pesquisa.

Todas as linhagens de fungos filamentosos em estudo encontradas no beiju hidrolisaram o amido, verificado pela produção de glicose pelo método de Somogyi-Nelson.

As amostras de *R. oryzae*, *A. niger*, *A. flavus* e a mistura de ambas, que previamente mostraram ser melhores produtoras enzimáticas foram selecionadas para

testes de sacarificação do amido para avaliar e confirmar a capacidade de conversão à glicose.

Para a padronização da quantificação de esporos utilizou-se uma taxa de esporos de $5,5 \times 10^7$ esporos/g fécula, esta quantidade mostrou-se eficiente para a produção de enzimas sacarificantes, podendo ser observado uma grande quantidade de conversão do amido.

De acordo com Soccol (1994) e Rimbault e Alazard (1980), a taxa de inoculação dos esporos deve ser suficiente para assegurar uma inoculação homogênea do substrato e também um início de crescimento rápido de modo a evitar uma eventual competição com os contaminantes. No entanto a taxa de inoculação não deverá ser muito elevada, pois uma alta densidade de esporos pode provocar um fenômeno de inibição e redução da porcentagem de germinação.

Oriol (1987) trabalhando com *Aspergillus niger* descreveu que taxas de inoculação de cerca de 10^6 a 10^7 esporos/g de suporte são suficientes para um bom crescimento dessa espécie de fungo. Barrios *et al.* (1988) observaram fenômenos de inibição da germinação dos esporos quando taxas de inoculação superior a 10^8 esporos/g de substrato são utilizadas.

Todos os ensaios realizados nesta pesquisa, mostraram uma variação de pH em torno de 5,0 a 5,5 sem a adição de ácidos ou bases para a sua padronização, tomando-se o pH 5~5,5 como padrão para todas as análises realizadas. Estes valores de pH são aqueles dos meios de culturas utilizados para o crescimento de fungos.

Conforme Soccol (1992), o fungo tem uma capacidade de crescimento, embora limitada, em condições extremas de acidez e alcalinidade. Essa característica é de extrema importância para os processos fermentativos, pois mostram que nessas condições a grande maioria das bactérias responsáveis pelas contaminações dos processos fermentativos são inibidas.

Singh *et al.* (2009), em estudo de otimização das condições de sacarificação de palha de trigo com celulasas produzidas por *Aspergillus heteromorphus*, obtiveram maiores resultados de ART (Açúcares redutores totais) a pH 5,0. Krishna *et al.* (1997) realizaram hidrólise de folhas de *Antigonum leptopus* e palha de cana-de-açúcar a pH 4,5. Chen *et al.* (2007) trabalharam com condições de pH 4,8 na hidrólise enzimática de sabugo de milho, obtendo 79% de rendimento.

A quantidade de nitrogênio adicionado (10% em relação à massa do amido) ao meio de cultivo foi ideal, pois os micro-organismos cresceram o suficiente para produzir o metabólito de interesse.

A adição de KNO_3 nas amostras foi de extrema importância para o processo, pois na ausência de nitrogênio, as cepas selecionadas não produziam de forma linear e nem satisfatória enzimas capazes de converter o amido em glicose. Nestas condições, em 48 horas de sacarificação, as espécies perdiam capacidade de conversão do amido à glicose.

De acordo com Soccol *et al.* (2005), a produção de amiloglicosidase por fungos, onde o substrato é suplementado com fontes de nitrogênio (natureza orgânica ou inorgânica), é praticada com sucesso para aumentar os rendimentos de amiloglicosidase em sacarificação. As fontes de nitrogênio podem ser componentes como sais de nitrato, amônio ou uréia.

Os micro-organismos não assimilam diretamente moléculas complexas como é o caso do amido, um polissacarídeo. Não havendo outro componente assimilável no meio, o micro-organismo passa a sintetizar aquelas enzimas específicas que degradam o substrato complexo em moléculas mais simples - neste caso as amilases - para que estas convertam o amido (fécula) em açúcares assimiláveis garantindo assim o crescimento e desenvolvimento do micro-organismo.

A importância da determinação da concentração de açúcares está ligada à capacidade de metabolismo de substrato pelo fungo. A produção de açúcares a partir do amido demonstra o potencial que a cepa tem para hidrolisar o amido, produzindo açúcar fermentescível.

A Tabela 01 apresenta os resultados da produção de glicose obtidos por sacarificação em frascos (balão) para cepas de *A.niger*, *A. flavus*, *R. oryzae* e a mistura dos esporos.

TABELA 01- Quantidade de glicose (g/l) produzida através do processo de sacarificação do amido pelas espécies *A.niger*, *A. flavus*, *R.oryzae* e pela mistura dos esporos pré selecionadas por sacarificação.

Espécies de fungos filamentosos	Produção de glicose (g/l) / Tempo de crescimento (horas)					
	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h
<i>A. niger</i>	0,33± 0,14	0,48± 0,04	0,77± 0,01	1,09± 0,05	1,65± 0,12	2,52±0,40
<i>A. flavus</i>	0,56± 0,30	0,72± 0,16	0,86± 0,02	1,54± 0,05	2,60± 0,14	3,58± 0,64
<i>R. oryzae</i>	1,44± 0,17	2,26± 0,07	3,52± 0,03	5,31± 0,31	6,90± 0,09	8,14± 0,13
Mistura dos esporos	0,11±0,09	0,28±0,08	2,12±0,12	1,67±0,24	1,79±0,25	2,34±0,16

NOTAS: Condições de cultura: taxa de inoculação: $5,5 \times 10^7$ esporos/ g fécula de mandioca; temperatura 30⁰C, 72 h de sacarificação; pH 5,0; 5,0% de fécula de mandioca, 10% de KNO₃. A porcentagem de KNO₃ foi calculada em relação à quantidade de fécula de mandioca.

Observou-se que os resultados para a produção de glicose foram superiores para *R. oryzae* em todos os intervalos de tempo, apresentando maior variação. Notou-se durante o experimento, que a partir do primeiro dia de sacarificação houve uma redução considerável da viscosidade do mosto de *R. oryzae* e *A. flavus* sendo pouco observado no mosto contendo *A. niger*.

Misturando os esporos de ambos os fungos percebeu-se um decréscimo a partir de 36h de produção de glicose, a competição destes fungos para se adequarem ao meio (requerendo mais nitrogênio para seu desenvolvimento) influenciou a conversão do amido à glicose.

A cepa *R. oryzae* apresentou uma maior atividade enzimática, pois utilizando-se os mesmos aspectos para todos os ensaios, a concentração de glicose sempre foi mais elevada. Este resultado é interessante, pois estudos já relacionados sobre a atividade enzimática de cepas de fungos filamentosos, mostraram o *A.niger* como principal agente sacarificante LE MENSE *et al.* (1947); TEIXEIRA (1950), entretanto, neste trabalho tem-se que levar em consideração o fato de todas as cepas estudadas serem selvagens. A Figura 21 ilustra os comportamentos destas cepas no decorrer da sacarificação.

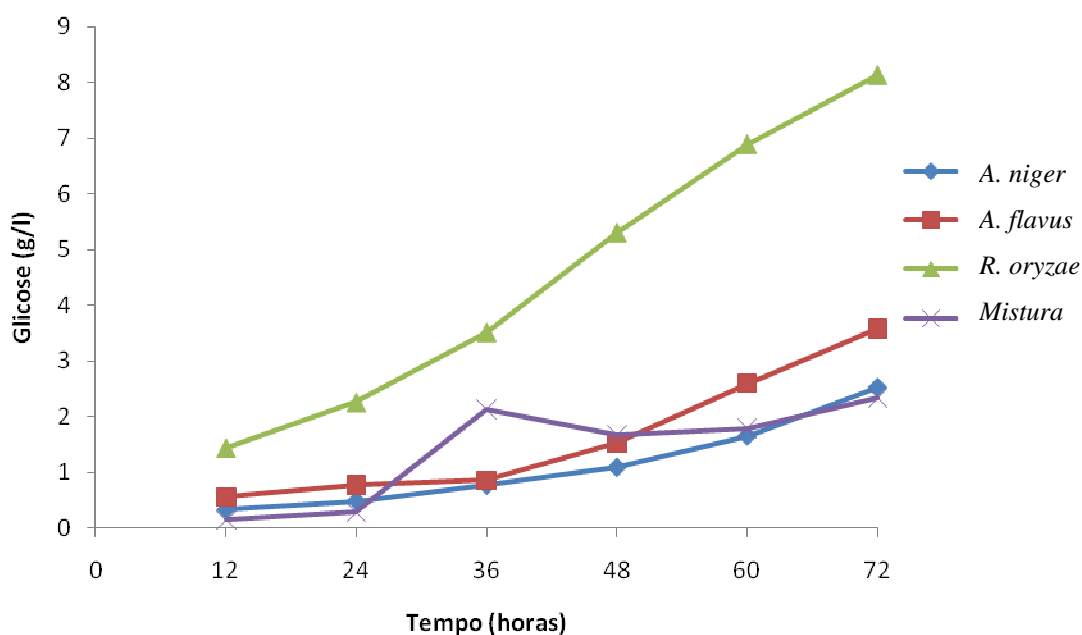


FIGURA 21: Resultados da cinética de sacarificação do amido por um período de 72h.

Spier (2005), estudando as atividades da α -amilase e da amiloglucosidase de espécies de *Rhizopus* (*R. oryzae*, *R. formosa*, e *R. arrhizus*) por 48h em intervalos de 12h, verificou que resultados para a produção de α -amilase foram semelhantes entre as espécies analisadas, entretanto, em relação à produção de amiloglucosidase, observou-se que a espécie *R. oryzae* LPB168 demonstrou produção de amiloglucosidase mais elevada. A concentração de α -amilase e da amiloglucosidase, está diretamente relacionada com a quantidade de glicose. Continuando o estudo, Spier (2005) demonstrou que cepas de *A.niger* obtiveram maior produção de amiloglucosidase nas mesmas condições de estudo, consequentemente uma maior produção de glicose.

Para ocorrer a quebra das ligações α -1,4 e α -1,6 do amido gelatinizado, são necessárias enzimas amilolíticas, enzimas estas produzidas por fungos filamentosos, como consequência, uma maior produção de glicose sugere uma maior produção de enzimas.

No processo de hidrólise da batata-doce por meio de células imobilizadas, segundo a avaliação de Souza (2005), utilizando em conjunto as enzimas α -amilase/ amiloglucosidase em diferentes proporções, foram obtidas concentrações de glicose no hidrolisado de: 0/50=25,123g/l; 0/100=31,672g/l; 50/0=37,433g/l; 50/50=122,768g/l; 50/100=128,703g/l numa concentração inicial de farinha de batata-doce a 10%, esta

descreve que a associação entre α -amilase e amiloglucosidase se mostrou imprescindível e os maiores valores de concentração de glicose foram obtidos para a relação α -amilase e amiloglucosidase, em microlitros, de 50:50.

4.3 Rendimento do processo de sacarificação

O fator de conversão relaciona a quantidade de açúcares redutores produzidos à concentração de amido consumido.

A Tabela 02 apresenta os ensaios realizados e seus respectivos valores de rendimento do processo de sacarificação. Nota-se que o rendimento da hidrólise do amido para o *R. oryzae* alcançou um valor de conversão de 78,02% em média (30°C e 50g/l de amido solúvel), obtendo o maior rendimento de sacarificação, seguida pelo *A. flavus* 71,55%, *A. niger* 57,17% e pela mistura dos esporos 48,02%. Lima *et al.* (2001) afirmam que não é possível a completa hidrólise do amido por α e β -amilases, pois elas não conseguem quebrar ligações α -1,6 das amilopectinas, que é um polímero de glicose semelhante à amilose, diferenciando estas por suas ramificações.

O bom rendimento da sacarificação pode ser explicado por esse aspecto, pois os componentes majoritários do amido são a amilose e a amilopectina, sendo a amilopectina em torno de 70% da composição, as α e β -amilases produzidas pelos fungos e a amiloglucosidase, convertem as cadeias de amilose e amilopectina respectivamente.

TABELA 02: Rendimento do processo de Sacarificação de uma suspensão de amido 50g/l após 192h com uma concentração de esporos $5,5 \times 10^7$ a 30°C.

Ensaio Sacarificação (Espécie)	Glicose (g/l)	Rendimento da Sacarificação (%)
<i>A.niger</i>	25,73	57,17
<i>A.flavus</i>	32,20	71,55
<i>R. oryzae</i>	35,11	78,02
<i>Mistura dos esporos</i>	21,61	48,02

Santana *et al.* (2007), utilizando amilases comerciais do tipo FORILASE NTL, chegaram a obter valores de rendimento de sacarificação próximos a 80% no ensaio a 45⁰C com 22,07g/l de amido solúvel presente inicialmente.

Neves (2004), estudando a produção de álcool a partir de crueira de mandioca, um resíduo da produção da farinha, promoveu a hidrólise utilizando α amilase Termamyl 120L e amiloglucosidase AMG 300L comerciais ambas da Novozymes. O hidrolisado obtido apresentou 97,49% de glicose, 1,35% de maltose e 1,16% de dextrinas, o autor justificou o alto poder de conversão devido uso da amiloglucosidase, que é capaz de quebrar as ligações α (1,6) e α (1,4), gerando grandes quantidades de glicose.

Já Augustini *et al.* (2008), produzindo um hidrolisado a partir do amido de mandioca por enzimas presentes na batata doce e quantificando os teores de açúcares redutores pelo método de Somogyi-Nelson, verificaram uma conversão de 26% do amido em açúcares redutores.

Banzon *et al.*,. (1949) realizaram experiências utilizando farelo embolorado na sacarificação do amido de mandioca, utilizando 10% desse resíduo e obtiveram um rendimento teórico entre 80-85%.

Ejiofor *et al.* (1996) obtiveram aproximadamente 80,7% de glicose no hidrolisado do amido proveniente de águas residuais do processamento de mandioca, utilizando enzimas microbianas α -amilase e glucoamilase. O restante dos açúcares compreendia malto-oligossacarídeos, principalmente maltose e isomaltose.

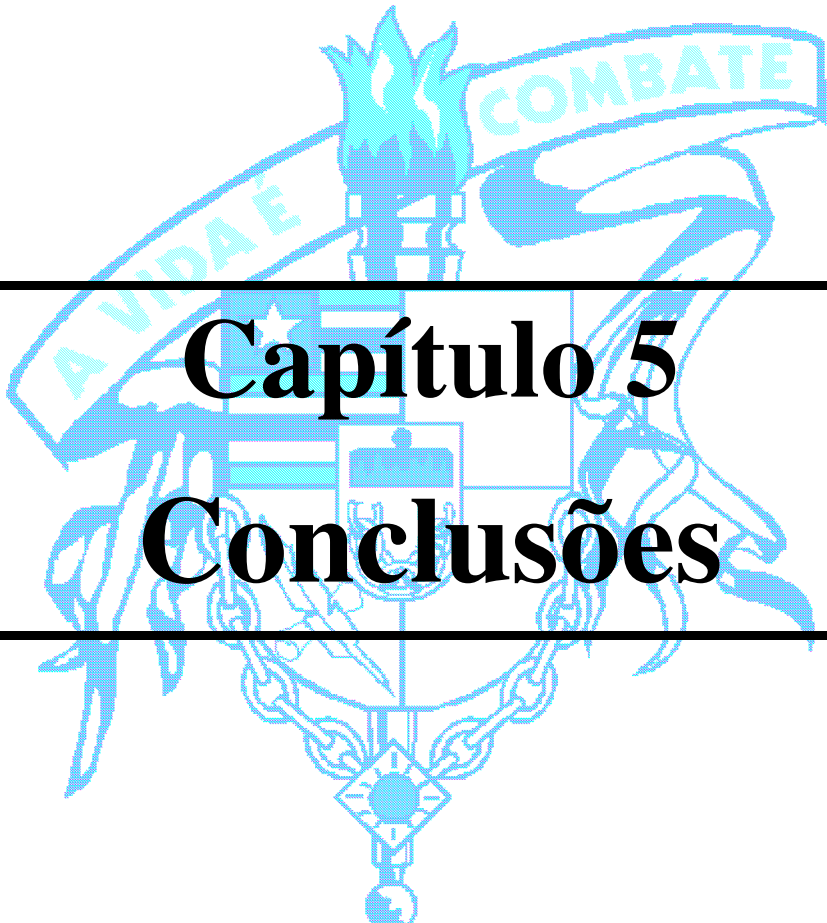
Estes resultados estão de acordo com Vieira (2004) que descreve a hidrólise como um desdobramento total das moléculas do amido que, são transformadas primeiramente em dextrinas pela ação da α -amilase e finalmente em glicose por ação da amiloglucosidase.

A tabela 03 apresenta o rendimento de sacarificação encontrado pelos autores acima, com suas respectivas enzimas sacarificantes.

TABELA 03: Rendimento do processo de Sacarificação encontrado por autores que utilizaram o amido como matéria prima.

Autores	Enzimas utilizadas	Rendimento da Sacarificação (%)
Santana <i>et al.</i> (2007)	FORILASE NTL	80%
Neves (2004)	Termamyl 120L e AMG 300L	97,49%
Augustini <i>et al.</i> (2008)	Enzimas da batata doce	26%
Banzon <i>et al.</i> (1949)	Farelo emborolado	80-85%
Ejiofor <i>et al.</i> (1996)	Enzimas α -amilase e glucoamilase	80,7%

Pode-se considerar que os resultados encontrados nesta pesquisa mostram um ótimo rendimento de sacarificação pela espécie *R. oryzae*, valores estes um pouco abaixo dos valores encontrados pelos autores supracitados. Entretanto deve-se levar em consideração que se utilizou as enzimas naturais, diretamente produzidas pelos micro-organismos ensaiados, já a maioria dos resultados obtidos pelos outros autores foram provenientes de experimentos que usaram enzimas comerciais.



Capítulo 5

Conclusões

5 CONCLUSÕES

- Dentre os três meios de cultura (PDA, SDA e Ex. Malte) utilizados para o crescimento dos fungos isolados do beiju de mandioca, o meio de cultura SDA, apresentou um resultado mais satisfatório, o qual foi utilizado nos repiques das culturas. Os fungos filamentosos encontrados foram: *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Rhizopus oryzae* além da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e várias bactérias que não foram identificadas.
- A amostra do fungo filamentoso *Rhizopus oryzae* demonstrou maior capacidade de conversão de amido em glicose visto pela sacarificação de fécula de mandioca quando comparada à produção das outras cepas do gênero *Aspergillus*.
- A conversão do amido em glicose apresentou boa eficiência de hidrólise em comparação com resultados existentes na literatura. O uso de fungos selvagens produtores de esporos se mostrou viável para o uso em sacarificação. Obteve-se uma quantidade máxima de glicose de 35,11g/l para o *R. oryzae* seguido de 32,20 g/l *A. flavus*, 25,73 g/l *A. niger* e 21,61 pela mistura dos esporos em 192h utilizando-se 50g/l de fécula e mandioca.
- O rendimento da sacarificação atingiu uma produção máxima para a amostra de *R. oryzae*, obtendo um percentual de 78,02%, com este resultado é possível afirmar que a utilização de esporos de *R. oryzae* são viáveis para sua utilização em sacarificação do amido de mandioca. Podemos confirmar então que a utilização de micro-organismos filamentosos selvagens torna-se uma opção para uso em sacarificação de mostras amiláceas.
- Quando utilizado KNO₃ (10%), esporos na quantidade de $(5,5 \times 10^7)$ e um pH 5 na sacarificação, ocasionou uma maior produção de glicose.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar a produção de enzimas amilolíticas α -amilase e amiloglucosidase a partir dos fungos filamentosos encontrados;
- Estudar as condições ideais para a produção (otimização das condições físicas e químicas de cultivo) e extração dessas enzimas produzidas por fungos selvagens;
- Realizar uma análise preliminar do custo de produção das enzimas α -amilase e amiloglucosidase;
- Influência do tipo de fungo nas características da bebida;
- Estudar todos os carboidratos presentes no hidrolisado.



Capítulo 7

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, D.M.G. **Respostas fisiológicas de duas linhagens de *saccharomyces cerevisiae* frente ao potássio durante a fermentação alcoólica.** 2000. 118p. Tese (Doutorado)- Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. Rio Claro, 2000.
- ANDRADE SOBRINHO, L. G.; BOSCOLO, M.; LIMA NETO, B. S.; FRANCO, D. W. **Química Nova**, 2002, 25, 1079.
- AQUARONE, E.; LIMA, U. A.; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Biotecnologia Industrial: Processos fermentativos e Enzimáticos.** Vol. 3. Editora Edgard Blucher Ltda. São Paulo – SP, Brasil 2001. 595p.
- ASSÊNCIO, D.C. **Manual de Ciência Molecular.** 1. Ed. São Paulo: USP, 2002. 4p.
- AUGUSTINI, D.; ZANELA, J.; ZOREL, H.E.; CUNHA, M.A.A. **Hidrólise enzimática natural do amido de mandioca para a produção de açúcares fermentescíveis.** XVI Encontro de Química da Região Sul. UTFPR, campus Pato Branco, Paraná, Brasil, 2008.
- AYERNOR, G. S.; HAMMOND, T. K.; GRAFFHAM, A. **The combination of ricemalt and amyloglucosidase for the production of sugar syrup from cassava flour.** African Journal of Science and Technology, v.3, n.1, p. 10-17, 2002.
- BANZON, E. I. *et al.* **Fermentative utilization of cassava.** The production of ethanol. Iowa State College Jour. Sci. 23: 219-235. 1949.
- BARNETT, J. A.; PAYNE, R. W. e YARROW, D. **Yeasts: characteristics and identification.** 3ed. Cambridge, U.K. ; New York, NY, USA: Cambridge University Press, 2000. ix, 1139 p. p.
- BARNETT, H.L.; HUNTER, B.B. **Illustrated genera of imperfect fungi.** 3ed. Minneapolis: Burgess. 1972.
- BARRIOS, G.J.; TOMASINI, A.; VINIEGRA, G.G.; LOPEZ, J. Penicillin production by solid state fermentation. **Biotechnology Letters.** v. 10, n. 11, p. 793-798, 1988.
- BILIADERIS, C. G. The structure and interactions of starch with food. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology.** v. 69, p. 60-78, 1991.
- BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A. **Introdução à Química de Alimentos.** 3ed. São Paulo: Varela, 2003. 238p.
- BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. **Química do Processamento de Alimentos.** 3ed. São Paulo: Varela, 2001. 143 p.

BORZANI, W.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A.; AQUARONE, E. (Coord.). **Biotecnologia Industrial: fundamentos**. 1 ed. São Paulo: Edgar Blucher, 2001, 254p.

CABELLO, C.; SAITO, I. M. **Produção de etanol a partir de hidrolisado obtido por tratamento hidrotérmico de farelo de mandioca**. Tese de Doutorado. Energ. Agric., Botucatu, vol. 21, n.3, 2006, p.34-44.

CARIOCA, J.O.B, ARORA,H.L. **Biomassa: Fundamentos e aplicações tecnológicas** . Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 1984.p. 49-331.

CARTA, F. S. **Hidrólise enzimática dos resíduos de fecularias e produção de ácido fumárico por fermentação de fungos do gênero *Rhizopus***. Dissertação de Mestrado em Tecnologia Química , Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 88f. 1999.

CARVALHO, S. M.S. **Análise das Enzimas Amilolíticas Produzidas por Microorganismos Isolados do Tarubá**. Manaus: UFAM, Dissertação de Mestrado em Ciências de Alimentos, Universidade Federal do Amazonas, 1999.

CEREDA, M. P. **Propriedades do Amido**. Série Culturas de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas. São Paulo: Fundação Cargill, v.1, cap. 8, 2001.p. 141-184.

CHISTÉ, R. C. *et al.* **Qualidade da Farinha de mandioca do grupo seca**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 26, n. 4, p. 861-864, 2006.

CHAPLIN, M. F.; BUCKE, C. **Enzyme Technology**. Cambridge: Cambridge University Press, 1990. p. 80-82.

CHEN, M.; XIA, L.; XUE, P. **Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic hydrolysate**. International Biodeterioration e Biodegradation. p. 85-89, 2007. Disponível em: <<http://www.sc.mahidol.ac.th/scbt/seminar/2007seminar691/article53.pdf>>. Acessado em 22 de Ago. 2009.

CHERRY, H. M.; HUSSAIN, T.; ANWAR, M. N. **Extracellular glucoamylase from the isolate *Aspergillus Fumigatus***. Pak. j. Bio. Science. 7v. 11, 1988-1992.

COELHO, T. **Alimentos: Propriedades Físico-Químicas**. 2. ed. Rio de Janeiro: cultura médica, 2002. P. 44-45.

CONN, E.E.; STUMPF, P. K. **Introdução à Bioquímica**. São Paulo: Edgard Blucher, 1975. 447p.

COSTA, J.A.V. **Estudo da Produção de Amiloglucosidase por *Aspergillus Níger* NRRL 3122 em Fermentação Semi-Sólida de Farelo de Arroz**. Tese de Doutorado em Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 1996. 203 p.

DECRETO Nº 2.314, de 04 de setembro de 1997. www.lei.adv.br/2314-97.htm Acesso em 22 de Setembro 2009.

DEMIATE, I.V.; WOSLACK, G.; CZELUSNIAK, C.; NOGUEIRA, A. **Determinação de Açúcares Redutores e Totais em Alimentos. Comparação Entre Método Colorimétrico e Titulométrico.** Engenharia de Alimentos, UEPG, p.65-78, 2002.

EJIOFOR, A.O.; CHISTI, Y.; MOO-YOUNG, M. Culture of *Saccharomyces cerevisiae* on hydrolyzed waste cassava starch for production of baking-quality. **Enzyme and Microbial technology.** p. 519-525, 1996.

FELDMANN, H. **Yeast molecular biology: a short compendium on basic features and novel aspects.**(2005) Disponível em: http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/yeast_biol/ Acesso em 10 de Ago. de 2009.

FENNEMA, O. **Química de Los Alimentos.** 2ed. Zaragoza : Acríbia, 2000. 1258p.

FRANCO, B.D.G.M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia de Alimentos.** São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

FUJII,M.; HOMMA, T.; TANIGUCHI, M. **Synergism of α -amylase and glucoamylase on hydrolysis of native starch granules.** Biotechnol Boneng., v.32, p. 910-915, 1988.

GUEDS, L. S.; FACCIOTTI, M. C. R.; ABOUTBOUL, H.; SCHNIDELL, W.; FARIA, J. B; SCHENBERG, A. C. G. **Síntese de glicoamilase por levedura geneticamente modificada visando a produção de etanol a partir de material amiláceo.** Ciência e cultura, São Paulo. V. 2, p. 1183-1188, 1984.

HAGER, C.; SPRADA, D.; HIRATSUKA, E. **Amilase Fúngica.** In: Bioquímica das fermentações, 1982. 52p.

HAMMOND, J.R.M. **Genetically-modified brewing yeasts for the 21st century.** Progress to date. Yeast, v.11, n.16, p. 1613-1627, 1995.

JACKMAN, E.A. Alcool Industrial. In: BU'LOCK, J.; KRISTIANSEN,B. **Biotecnologia básica.** Zaragoza: Acríbia, 1991. 577p.

JA'AFURU, M. I.; FAGADE,O. E. **Cellulase Production and Enzymatic Hydrolysis of Some Selected Local Lignocellulosic Substrates by a Strain of *Aspergillus niger*.** Research Journal of Biological Science, 2(1), p. 13-16, 2007.

JALAVICHARANA, K. **Conversion of Rice by submerged culture microbial enzyme preparations.** Joseph E. Seagram & Sons, Inc., Res. Lab. Report 1710-E: 1-15, tab. 1-6. 1950.

KAAIJ, R. M. V. D. **Alpha-glucan acting enzymes in *Aspergillus niger*: Diversity in Enzymatic activities end functions.** Dissertação de mestrado, University of Groningen, 2007.

KRISHNA, S. H.; PRABHAKAR, Y.; RAO, R. J.; **Saccharification studies of lignocellulosic biomass from *Antigonium leptopus* Linn.** Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, v.59 (1), p. 39-42, 1997.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. **Tratado de Micologia Médica**. 9ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

LEONEL, M.; CABELLO, C. **Hidrólise Enzimática do Farelo de Mandioca: Glicose e Álcool**. In: Cereda, M. P. (Coord). Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas sul americanas. São Paulo: Fundação Cargill, v.4, cap. 22, 2003.p. 280-291.

LEONEL, M.; SARMENTO, S. B S.; CEREDA, M. P. Processamento da araruta (*Maranta Arundinacea*) para extração e caracterização da fração amilácea. **Brazilian Journal of Food Tecnology**. v. 5, p. 151-155, 2002.

LEHNINGER, A. G.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios da Bioquímica**. 3^a ed. São Paulo: Savier, 2002.

LE MENSE, E. H. et al. **Production of mold amylase in submerged culture**. Jour. Bact. 54: 149-159. 1947.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E.; BORZANI, W. **Tecnologia das fermentações**. São Paulo, Edgard Blucher, (Biotecnologia I), 1975.

LIMA, U.A. et al. **Processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Ed. Edgard Blucher, 2001. 598p. v.3. (Biotecnologia Industrial)

LIU, Z.; ZHANG, G.; LIU, S. **Constricting na amylolytic brewing yeast *Saccharomyces pastorianus* suitable for accelerated brewing**. Jornal of bioscience and bioengineering. Vol.98, n^o6, p. 414-419. 2004

LOPES, C. H. Glossário de termos técnicos para a indústria sucro-alcooleira. Piracicaba: **Instituto do açúcar e do álcool**, 1987. 32p.

MAGRO,J.A. Nova maneira de colher manualmente a cana queimada visando a qualidade, In: **25^a Reunião Anual Encontros Fermentec**, Águas de São Pedro. Fermentec. p. 08, 2005.

MENEZES,E.A.; TRINDADE,E.C.P.; COSTA, M.M.; FREIRE, C.C.F.; CAVALCANTE, M.S.; CUNHA, F.A. **Airborne fungi isolated from Fortaleza city, state of Ceará, Brazil**. Rev. Inst. Med. Trop. 46(3): 133-137, 2004.

MENEZES, M.; Silva-Hanlin, D.M.W. **Guia Prático para Fungos Fitopatogênicos**. Recife: UFRPE, Imprensa Universitária, 1997. 106p.

MENEZES, T. J. B. **Etanol, o combustível do Brasil**. São Paulo: Agronômica Ceres,1980.

MORRISON, W. R. Starch lipids and how they relate to starch granule structure and functionality. **Cereal Foods World**, v. 40, p. 437-446, 195.

NASCIMENTO, R.F.; BEZERRA, C.W.B.; FURUYA, S. M. B.; SCHULTZ, M. S.; POLASTRO, L. R.; LIMA NETO, B. S.; FRANCO, D. W.; J. **Food Comp. Analysis**. 1999, 12, 17.

NEDER, R.N. Microbiologia: **Manual de laboratório**. São Paulo: Nobel S.A., 1992.p.46-54.

NEVES, V.J.M. **Uso do resíduo da produção de farinha de mandioca (crueira) na produção de álcool fino**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista. Botucatu, São Paulo, 2004.

NIGAM,P.J.; SINGH,D. **Enzyme and microbial systems involved in starch processing**. Enzyme and Microbial Technology, New York, v. 19, n. 6, p. 770-778, 1995.

NOVAES, F.V.; STUPIELLO, J.P.; OLIVEIRA, A. J.; DELGADO, A. A.; OLIVEIRA, E.R.; CESAR, M.A.A.; VALSECCHI, O. **I curso de extensão em tecnologia de aguardentes (apontamentos)**. Piracicaba, ESALQ/USP. Dept^o. De tecnologia rural, 1974, 104p.

OLIVEIRA, R.H.A.; SUDO.J.T.C.; RESENDE,M.M. **Estudo dos Processos de Sacarificação, Fermentação e Destilação de Cascas e Pontas de Mandioca no Processo de Obtenção de Aguardente**. UFU,2008.

ORIOLE, E. **Croissance d'Aspergillus niger sur milieu solid: importance de l'eau de l'activité de l'ea**, 113f. Thèse (Doctorat) Microbiologie, INSA Toulouse, 1987.

PARK, Y. K.; ZENIN, C. T.; UEDA, S.; MARTINS, C. O.; NETO, M. P. S. **Microflora in Beiju and their Biochemical Characteristics**. Journal of Fermentation Technology, v. 60, n^o1, p 1-4. 1982.

PELCZAR. **Microbiologia-Conceitos e Aplicações**. Cap. 10. 4. Ed. São Paulo: Makron Books, 1998. P. 258-271.

PRADO, F.C. **Desenvolvimento de Bioprocesso em Escala Semipiloto para Produção de Ácido Cítrico por Fermentação no Estado Sólido a Partir do Bagaço de Mandioca**. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Alimentos, UFPR, 2002. 81p.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os reinos dos fungos**. 2 ed., v. 1. Santa Cruz do Sul: EDUNISC, 2004. 605p.

RABELO, S. C. **Avaliação de desempenho do pré-tratamento com peróxido de hidrogênio alcalino para a hidrólise enzimática de bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2007

RAIMBAULT, M.; ALAZARD, D. Culture Method to Study Fungal Growth in Solid State Fermentation. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, v.9, 1980. p. 199-209.

REED, G. **Enzymes in Food Processing**. 2ed. New York: Academic Press Inc., 1975.p. 62-87

ROITMAN, I.; TRAVASSOS, L.R.; AZEVEDO, J. L.; **Tratado de Microbiologia**. São Paulo, Manole Ltda 1988. 186 p.

ROSAS, J. Curso de Biologia Molecular e Celular. Enzimas: **Aceleradores de las Reacciones Químicas de los Seres Vivos**. Disponível em: <<http://www.Interbiologia.virtualave.net/molécula/enzimas.html>> Acesso em 12 Mar 2009.

SANTANA, N. B. **Eficiência da hidrólise de amido de mandioca por diferentes fontes de enzima e rendimento da fermentação alcoólica para produção de etanol**. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Alimentos, UFV, 2007. 104p.

SANTOS, G. **Utilização de resíduos agroindustriais para produção de amiloglucosidase por *Aspergillus awamori***. 2006. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ponta Grossa – PR. 2006. 81p.

SAXENA, R. K.; DUTT, K.; AGARWAL, L.; NAYYAR, P. **A highly thermostable and alkaline amylase from a bacillus sp.** PN5. Bioresource Technology, 98(2), p. 260-265, 2007.

SHREVE, R.N; BRINK JR, J.A. **Indústrias de Processos Químicos**. Rio de janeiro, Guanabara Koogan.2008. p. 452-486

SIDRIM,J.J.C.;MOREIRA,J.L.B. **Fundamentos Clínicos e Laboratoriais da Micologia Médica**. Rio de janeiro, Guanabara Koogan. 287p. 1999

SINGH, A.; SINGH, N.; BISHNOI, N. R. **Production of Cellulases by *Aspergillus heteromorphus* from wheat straw under submerged fermentation**. International Journal of Enviromental Science and Engineering, 1:1, 2009. Disponível em: <http://www.waset.org/journals/ijese/v1/v1-1-4.pdf>. Acessado em 22 de Ago. 2009.

SOCOOL, C.R.;CABRERO,M.A.;ROUSSOS, S.; RAIMBAULT, M. **Selection of *Rhizopus* for Growing on Raw Cassava**. VI International Symposium on microbial Ecology, Barcelona, 6-11 Septembre, 1992.

SOCOL, C.R.; MARIN, B.; RAIMBAULT, M.; LEBEALT, J.M. Breeding and Growth of *Rhizopus* in Raw cassava By Solid State Fermentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.41. 1994. P.330-336.

SOCOL,C.R;ROJAN,P.J;PATEL,A.K;WOICIECHOWSKI,A.L; VANDERBERGHE, L.P.S; PANDEY, A. **Glucoamylase**. In: **Enzyme Technology**. New Delhi: Asiatec Publishers Inc., 2005.p. 221-230.

SOMOGYI, M.A. **A New Reagent for the Determination of Sugars**. J. biol. Chem. 160p. 61-68. 1945.

SOUZA, A.F.B.C. **Avaliação do Processo de Hidrólise e Fermentativo de Biomassa de Batata-doce (*Ipomoea batatas* (L.) lam) por meio de Células Imobilizadas para Produção de Etanol.** Dissertação de mestrado em Ciências do Ambiente, UFT, 2005.80p.

SPIER, M.R. **Produção de Enzimas Amilolíticas Fúngicas α - Amilase e Amiloglucosidase por Fermentação no Estado Sólido.** Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Alimentos, UFP, 2005. 157p.

SURMELY, R.; ALVAREZ, H.; CEREDA, M.P.; VILPOUX, O. **Hidrólise do amido.** IN: Cereda, M.P.; Vilpoux, O.F. (Coord). Tecnologia, Usos e Potencialidade de Tuberosas Amiláceas Sul Americanas. São Paulo: Fundação Cargill, V.3, Cap. 15, 2003. P. 377-449

TUBB, R. S. Amylolytic Yeast for Commercial Applications. **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v. 4, n. 1,p. 98-104, 1986.

TEIXEIRA,C. G. Produção de álcool de mandioca, utilização de bolores na sacarificação do amido. **Bragantia**, Campinas, Out de1950, nº10, v.10.

TEIXEIRA, M. F. S.; MATSUURA, A. B. J., SOARES, C. S. S. S.. **Micologia Médica: Manual de Laboratório.** Manaus: UFAM, 111p., 1999.

TROVATI,J.;GIORDANO,R.L.C. **Produção de Etanol a Partir de Amido Utilizando Amiloglicosidase e Levedura Coimobilizadas em Gel de Pectina.** Programa de Pós graduação em Engenharia Química/ UFSCar.

USA (2004). *Rhizopus sp.* Disponível em: <http://www.doctorfungus.com/thefungi/rhizopus.htm> Acesso em: 20 de ago. 2009

VENTURINI FILHO,W.G.; MENDES,B. do P. Fermentação alcoólica de raízes tropicais. In: CEREDA, M.P.; VILPOUX, O.F. (Cord.). **Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas sul americanas.** São Paulo: Fundação Cargill, v.3, cap. 19, 2003.p. 530-575.

VENTURINI FILHO, W.G. **Tecnologia de bebidas: matéria prima, processamento, BPF/APPCC**, coordenador- São Paulo: Edgard Blucher, 2005.p.485-548.

VIEIRA, B. A. H. (2000) Como Utilizar a Câmara de Neubauer. [HTTP://starmedia.orbita.com/~bervieira](http://starmedia.orbita.com/~bervieira). Acesso em: 18 de Ago. 2009.

VIEIRA, F.C.do. **Efeito do Tratamento com Calor e Baixa Umidade sobre Características Físicas e Funcionais dos Amidos de Mandioquinha-Salsa (*Arracacia Xanthorrhiza*), de Batata-doce (*Ipomoea batatas*) e de Gengibre (*Zingiber officinale*).** Dissertação de Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos, 2004, Escola Superior de Agricultura. Rio de Janeiro, 102p.

WAINWRIGHT, M. **Introducción a la biotecnología de los hongos.** Zaragoza: Acribia, 1995. 228p.

WHISTLER, R. L.; DANIEL, J. R. Molecular Structure of Starch. In: WHISTLER, R. L.; BEMILLER, J. N.; PASCHALL, E. F. (Eds). **Starch: Chemistry na Technology**. New York: Academic, 1984. p. 153-182

ZAITS, C.; CAMPBELL, I.; MARQUES, S.A.; RUIZ, L.R.B.; SOUZA, V.M. **Compêndio de Micologia Médica**. Rio de Janeiro: Medsi, 1998.

ANEXO 1 – Reagentes, materiais e equipamentos**Tabela 03:** *Relação de reagentes, materiais e equipamentos*

Reagentes, materiais e equipamentos	Fabricante
SDA-Sabouraud Dextrose Ágar	HIMEDIA
PDA-Potato Dextrose Ágar	HIMEDIA
Malt extract ágar	HIMEDIA
Fosfato dissódico heptahidratado- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	LAFAN
Tartarato duplo de sódio e potássio- $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$	AUDAZ
Hidróxido de sódio- NaOH	LAFAN
Sulfato de cobre- CuSO_4	DINÂMICA
Sulfato de sódio- Na_2SO_4	LAFAN
Molibdato de amônio- $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$	AUDAZ
Ácido sulfúrico- H_2SO_4	LAFAN
Arseniato de sódio	ISO FAR
Glicose- $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	LAFAN
Tween 80	AMRESCO
Agitador de tubos AP56	PHOENIX
Balança analítica FA-2104N	BIOPRECISA
Centrifuga BabyI 206	FANEM
Autoclave vertical AV-75	PHOENIX
Microscópio óptico Eclipse E100	NIKON
Agitador magnético 78HW-1	BROMIXER
Estufa bacteriológica BOD Q-315M	QUIMIS
Banho maria com circulação MA159	MARCONI
Espectrofotômetro UV-VIS UV-2550	SHIMADZU
Papel filtro qualitativo	QUALITY
Pipeta automática regulável	DIGIPET
Câmara de Neubauer	PRECICOLOR HBG
Fécula de mandioca	AMAFIL

ANEXO 2 – Cálculo da contagem de esporos usando a câmara de Neubauer

Cálculo da contagem de esporos usando a câmara de Neubauer

Considerando-se que a câmara de Neubauer contém 25 quadrículos. Entre a câmara e a lamínula, forma-se um filme líquido da diluição preparada de 0,1mm de espessura. A dimensão de cada quadrículo é de 0,2mm x 0,2mm. Portanto, em cada quadrículo temos o volume de 4×10^{-6} ml:

Equivalências:	1ml	1cm^3
	1ml	1000 mm^3
	Xml	$0,004\text{ mm}^3$
	$X = 0,004\text{ mm}^3$	4×10^{-6}
	1000 mm^3	1ml

Portanto, em um quadrículo temos 4×10^{-6} ml

ANEXO 3 – Preparo das soluções de Somogyi-Nelson

Reativo de Somogyi: Pesou-se 28g de NaHPO_4 e adicionou-se 40g de tartarato duplo de sódio e potássio em 700ml de água. Adicionou-se 100 ml de NaOH 1N. Gotejou-se 80 ml de solução de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 10%, sob agitação constante. Juntou-se 180g de Na_2SO_4 e completou-se o volume com água a 1000 ml. Deixou-se em repouso por dois dias e filtrou-se em papel qualitativo, guardando o reativo em frasco escuro a 37° C.

Reativo de Nelson: Pesou-se 50g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e dissolveu-se em 800ml de água. Adicionou-se 52 ml de H_2SO_4 concentrado. Juntou-se 6g de hidrogênio arseniato de sódio dissolvidos em 50 ml de água. Completou-se o volume a 1000 ml. Deixando em frasco escuro por dois dias e conservando a 37° C.