

## Artigo

## Identificação e Atividade Sacarificante da Flora Microbiana Selvagem Empregada na Fabricação da Tiquira

Ribeiro, D. M. L.; Moreira, L. R. M. O.; Monteiro, C. A.; Bezerra, C. W. B.\*

Rev. Virtual Quim., 2019, 11 (6), 1949-1960. Data de publicação na Web: 2 de janeiro de 2020

<http://rvq.s bq.org.br>

### Identification and Saccharifying Activity of Wild Microbial Flora Used in the Manufacturing of Tiquira

**Abstract:** Tiquira is an alcoholic distillate handmade prepared from the simultaneous saccharification and fermentation of cassava. The saccharification and fermentation processes are carried out by wild microorganisms, randomly harvested, from the natural exposure of beijos to the environment. The growth of these microorganisms occurs for a period of 8 days, and starch hydrolysis and sugar fermentation are performed for the same period. As there are several strains collected, the quality of the distillate is compromised, resulting in defects in the composition of the drink and in the variable process yield. The objective of this work was to isolate, identify and select, among the native microorganisms, the best saccharifying and fermentative agents, enabling the production of inoculum to reduce the process time and to homogenize Tiquira's secondaries. Among the selected strains, it was possible to identify and characterize three species of filamentous fungi: *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* and *Rhizopus oryzae*. For all of them, SDA (Saboroud Dextrose Agar) medium, at 30 °C, was the one that best allowed fungal growth. Regarding starch saccharification yield, *R. oryzae* achieved a conversion value of 78.0 % (30 °C, 5.5 x 10<sup>7</sup> spore content, pH 5 and 50 g/L soluble starch), whereas *A. flavus*, *A. niger*, and the mixture of all of them, had a conversion rate of 71.5; 57.2 and 48.0 %, respectively, which highlights that the use of autochthonous filamentous microorganisms is an option for the saccharification of starch samples.

**Keywords:** Starch; saccharification; filamentous fungi; tiquira.

### Resumo

Tiquira é um destilado alcoólico preparado artesanalmente a partir da sacarificação e fermentação simultâneas do beiju da mandioca. Os processos de sacarificação e fermentação são realizados por micro-organismos selvagens, colhidos ao acaso, a partir da exposição natural dos beijos ao meio. O crescimento destes micro-organismos ocorre por um período de 8 dias e, por igual período, é realizada a hidrólise do amido e a fermentação dos açúcares. Como são diversas as linhagens coletadas, a qualidade do destilado fica comprometida, implicando nos defeitos de composição da bebida e no rendimento variável do processo. O objetivo deste trabalho foi isolar, identificar e selecionar, dentre os micro-organismos nativos, os melhores agentes sacarificantes e fermentativos, facultando a produção de inóculos para a redução do tempo do processo e homogeneização dos secundários da Tiquira. Dentre as cepas selecionadas, foi possível identificar e caracterizar três espécies de fungos filamentosos: *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Rhizopus oryzae*. Para todas elas, o meio SDA (Saboroud Dextrose Ágar), a 30 °C, foi o que melhor permitiu o crescimento dos fungos. Com relação ao rendimento da sacarificação do amido, *R. oryzae* alcançou um valor de conversão de 78,0 % (30 °C, quantidade de esporos 5,5 x 10<sup>7</sup>, pH 5 e 50 g/L de amido solúvel), enquanto que o *A. flavus*, o *A. niger*, bem como a mistura de todos eles, apresentaram uma percentagem de conversão de 71,5; 57,2 e 48,0 %, respectivamente, evidenciando que a utilização de micro-organismos filamentosos autóctones é uma opção para uso em sacarificação de amostras amiláceas.

**Palavras-chave:** Sacarificação; fungos filamentosos; tiquira.

\* Universidade Federal do Maranhão, Departamento de Química, Avenida dos Portugueses 1966, CEP 65085-580, Campus do Bacanga, São Luís-MA, Brasil.

✉ [cwb.bezerra@ufma.br](mailto:cwb.bezerra@ufma.br)

DOI: [10.21577/1984-6835.20190136](https://doi.org/10.21577/1984-6835.20190136)

## Identificação e Atividade Sacarificante da Flora Microbiana Selvagem Empregada na Fabricação da Tiquira

Diogo Marcelo Lima Ribeiro,<sup>a</sup> Lucy Rose de Maria Oliveira Moreira,<sup>b</sup>  
Cristina de Andrade Monteiro,<sup>a</sup> Cícero Wellington Brito Bezerra<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Universidade CEUMA, Departamento de Farmácia, Rua Josué Montello 1, Renascença II, CEP 65075-120, São Luís-MA, Brasil.

<sup>b</sup> Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Amazônia Legal- Rede BIONORTE, Avenida dos Portugueses 1966, Bacanga, CEP 65080-805, São Luís-MA, Brasil.

<sup>c</sup> Universidade Federal do Maranhão, Departamento de Química, Avenida dos Portugueses s/n, Campus do Bacanga, CEP 65085-580, São Luís-MA, Brasil.

[cicero@ufma.br](mailto:cicero@ufma.br)

*Recebido em 17 de setembro de 2018. Aceito para publicação em 10 de dezembro de 2019*

### 1. Introdução

### 2. Parte Experimental

2.1. Preparo das soluções de esporos de *Aspergillus niger* e *flavus*

2.2. Preparo das soluções de esporos de rhizopus

2.3. Sacarificação

2.4. Análise do substrato fermentado

2.5. Determinação de açúcares redutores

2.6. Rendimento do processo de sacarificação

### 3. Resultados e Discussão

3.1. Isolamento e identificação dos micro-organismos

3.2. Sacarificação

3.3. Rendimento do processo de sacarificação

### 4. Conclusão

## 1. Introdução

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.<sup>1</sup>

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 emprega 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 deixados ao acaso, em atmosfera úmida, para coleta e crescimento de bolores, cujos esporos são naturais da região, como ilustra a Figura 1.



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

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 presentes, e por um período de oito dias, processos paralelos à sacarificação do amido e fermentação dos açúcares são esperados, diminuindo o rendimento da conversão e limitando 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.

Para Venturini Filho,<sup>2</sup> o processo artesanal é a causa da baixa representatividade da tiquira no mercado de destilados, mesmo no Estado do Maranhão.

Com a qualidade questionável, tempo elevado de produção, *bouquet* e teor de secundários variáveis, a tiquira não consegue competir com a aguardente de cana, produto de composição mais uniforme e de preço mais acessível.

Por outro lado, o problema da composição da tiquira não é meramente técnico, mas de saúde. Os defeitos de produção provocados pela atividade dos micro-organismos podem acarretar a presença de compostos altamente prejudiciais, de elevada toxicidade, a exemplo do metanol e do carbamato de etila.<sup>3-6</sup>

Assim, com presente trabalho, foram identificadas algumas linhagens nativas presentes nos beijos e aferidas suas capacidades sacarificantes, com o objetivo de produção futura de inóculos ou pés de cuba, contribuindo para a redução do tempo de produção, uniformização da composição do destilado e para a qualidade do produto.

## 2. Parte Experimental

As amostras de beijus com os micro-organismos foram coletadas diretamente de alambiques do interior do Estado do Maranhão, nas localidades: Humberto de Campos e Boiada (Povoado próximo de Barreirinhas), devidamente identificadas, ambientadas (em sacos plásticos) e conduzidas até o Laboratório de Micologia (Núcleo de Doenças endêmicas e parasitárias, Universidade CEUMA).

Frações dos beijus foram coletadas, de acordo com suas respectivas colorações, e trituradas para posterior pesagem. Em seguida, a 1,00 g da farinha foram adicionados 150 mL de água destilada e a suspensão foi deixada em agitação 15 min. Após a homogeneização do meio, foram realizadas algumas diluições ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ) em tubos de ensaio previamente estéreis (121 °C por 15 min em autoclave) contendo água destilada.

300 µL das diluições foram retirados e semeados 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 min 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 10 mL 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.<sup>7,8</sup>

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 já estabelecida na literatura.<sup>7,9</sup>

Para análise macroscópica, os fungos isolados foram inoculados por ponto central em placas de Petri, contendo meio SDA. As análises foram realizadas pela técnica de microcultivo em lamínulas,<sup>7</sup> com pequenas adaptações.

Para a verificação das características morfológicas das linhagens por microcultivo, foram preparadas placas contendo uma fina camada de meio SDA. Após procedimento em autoclave (121 °C, 15 min), o meio foi seccionado nas dimensões de 1 x 1 cm e, com ajuda de uma pinça estéril, uma pequena quantidade dos fungos foi transferida para a lâmina sobre o algodão contido na placa previamente esterilizada. Pequenas porções do micélio da cultura de *R. oryzae*, *A.niger* e *A. flavus* (separadamente) foram semeadas nas bordas do meio de cultura 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.

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

O método utilizado para conservação das cepas foi da repicagem em SDA. O meio foi preparado diluindo-o em água destilada e distribuindo em tubos de 20 mL, na quantidade de 10 mL por tubo e autoclave na temperatura de 121 °C, por 15 min. Após a esterilização, o meio foi solidificado em posição inclinada dentro de tubos. 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.

Em adição, a partir dos respectivos cultivos, foi realizada a identificação automatizada por inoculação no painel YEAST-ID do Sistema VITEK (BioMérieux), após 48 horas de incubação dos microrganismos, e seguindo as orientações indicadas pelo fabricante.<sup>10</sup>

### 2.1. Preparo das soluções de esporos de *Aspergillus niger* e *Flavus*

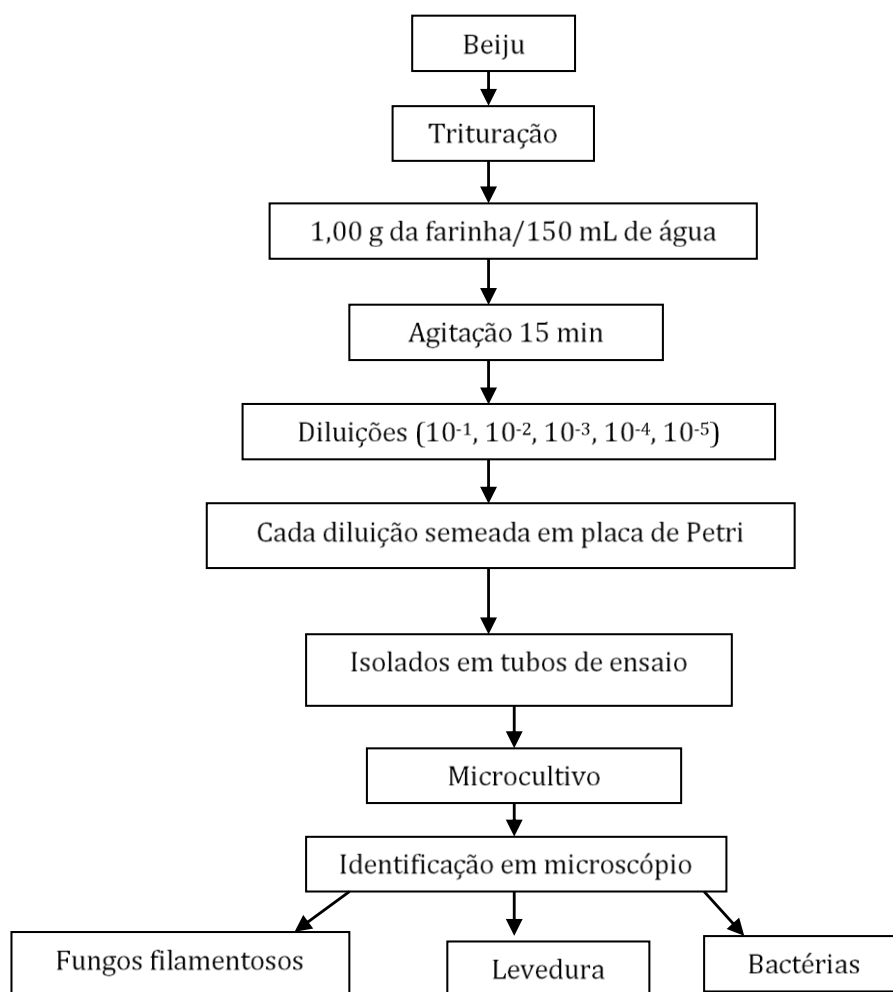
Os esporos dos fungos do gênero *Aspergillus* foram produzidos em placas de

Petri estéreis contendo o meio SDA. O meio foi esterilizado a 121 °C durante 15 min. 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.<sup>11-13</sup>

Os esporos foram recuperados da superfície do meio utilizando-se 10 mL de água destilada estéril, com a ajuda de uma espátula estéril para a realização da raspagem dos esporos. A suspensão obtida foi conservada a 4 °C por até 30 dias.

## 2.2. 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 formada de fungo (micélio) foi totalmente retirada com auxílio de uma alça de platina, adicionando-a em tubos contendo 20 mL de água deionizada estéril e 0,2 % de tween 80, seguida de agitação por 15 min. A concentração de esporos na suspensão obtida foi calculada pela contagem em microscópio usando câmera de Neubauer. A Figura 02 resume as etapas de preparo do beiju de mandioca para identificação de micro-organismos.



**Figura 2.** Fluxograma do processo de isolamento e identificação dos micro-organismos encontrados no beiju de mandioca

### 2.3. Sacarificação

A sacarificação foi conduzida em balão de fundo chato de 250 mL, em condição de repouso, contendo 120 mL de suspensão a 5 % de fécula de mandioca, a 30 °C (estufa) durante 72 e 192 h, sendo retirada alíquotas em intervalos de 12 h para as devidas análises.

Para preparo da suspensão a 5 % empregou-se a fécula de mandioca comercial da marca Amafil. Também foi empregada uma solução a 10 % de KNO<sub>3</sub>. A solução foi esterilizada a 121 °C por 15 min para propiciar 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 x 10<sup>7</sup> esporos/g de amido, reproduzindo a concentração ótima relatada na literatura.<sup>14</sup> Assim, imediata a gelatinização, 5,5x10<sup>7</sup> esporos (agente sacarificante) por g de fécula, foram adicionados ao meio.

### 2.4. Análise do substrato fermentado

5 mL de cada amostra foram colocadas em suspensão em 50 mL de água deionizada. Os sistemas ficaram sob agitação contínua durante 30 min. Em seguida foram filtrados para a remoção dos sólidos, obtendo-se extratos claros, os quais foram centrifugados a 3000 rpm, por 15 min, e os respectivos sobrenadantes utilizados nas determinações dos açúcares redutores e consumo do amido.

### 2.5. Determinação de açúcares redutores

A determinação de açúcares redutores foi realizada pelo método espectrofotométrico de Somogyi-Nelson.<sup>15,16</sup> Em resumo, 1,0 mL de cada amostra filtrada e neutralizada com solução de NaOH 1,0 M foi transferido para um tubo de ensaio rosqueado e acrescentado 1,0 mL do reativo de Somogyi. Após banho-maria fervente por 10 min e resfriado a temperatura ambiente, foram acrescentados 1,0 mL do reativo de Nelson e 7,0 mL de água. Após homogeneização dos sistemas, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 535 nm.

### 2.6. Rendimento do processo de sacarificação

O rendimento do processo de sacarificação foi definido como a porcentagem de amido que foi convertida em glicose, assumindo que 100 g de amido produzem 100 g de glicose.<sup>17</sup> O resultado foi obtido utilizando a equação 1, em que 0,9 representa o teor de amido presente na amostra comercial empregas (Amafil 90 %).

$$\% \text{ Rendimento} = \frac{\text{Conc.glicose}}{\text{Conc.amido} \times 0,90} \times 100 \text{ (Eq. 1)}$$

## 3. Resultados e Discussão

### 3.1. Isolamento e identificação dos micro-organismos

Dos micro-organismos observados nas amostras dos beijos de mandioca, entre bactérias (não identificadas) e fungos, destacaram-se três espécies de fungos filamentosos: *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Rhizopus oryzae*,<sup>7-9</sup> e o *Saccharomyces cerevisiae*.

A Figura 3 apresenta o crescimento destes fungos em diferentes meios de cultura, a 30 °C. O tempo total de monitoramento do crescimento foi de 48 h durante os quais pode-se observar: coloração, textura, topografia e mudança de cor do meio de cultura, características estas muito importantes para identificação macroscópicas dos fungos.

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

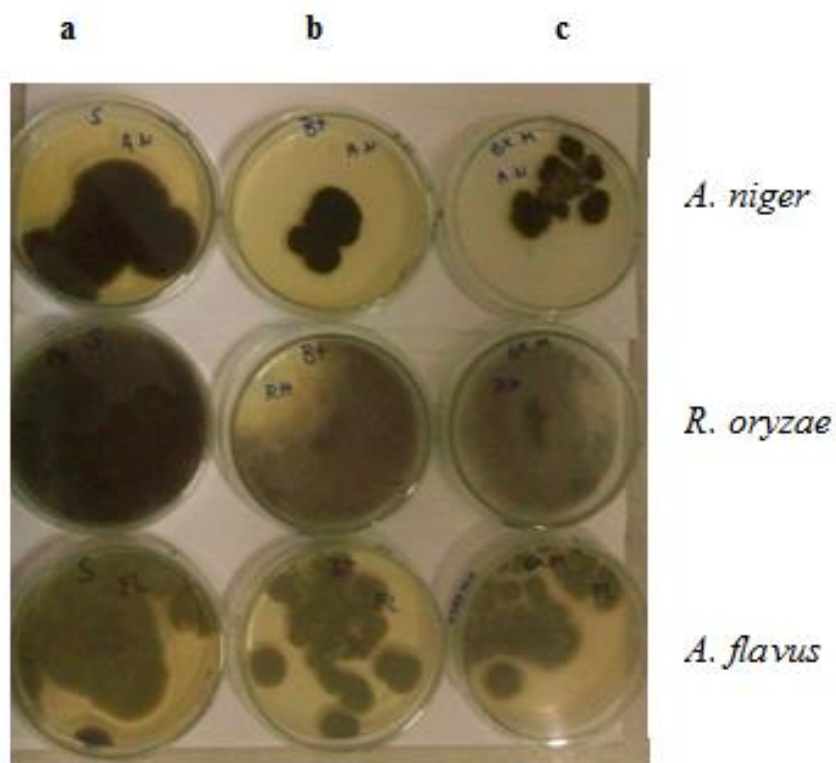
Diversas chaves de identificação disponíveis na literatura foram consultadas para o estabelecimento da identidade dos fungos em questão.<sup>7-9</sup> Na Figura 4 (a-c) estão contidas fotos das culturas identificadas: *A. niger*, *R. oryzae* e *A. flavus* observadas por microscopia óptica.

Importante a identificação destes fungos filamentosos nos beijos pelo fato deles serem excelentes produtores de amilases ( $\alpha$ -amilase,  $\beta$ -amilase e amiloglicosidase), exoenzimas capazes de sacarificar o amido, liberando unidades de glicose.<sup>18-20</sup> De acordo com os estudos de Park *et al.*,<sup>21</sup> a flora natural de beijos coletados em 3 diferentes unidades de fabricação de tiquira no maranhão, próximas da capital, foram *Aspergillus niger* e *Paecilomyces* sp. como espécies predominantes, sendo também encontrada quantidade moderada de *Rhizopus* sp. e da *Neurospora*.

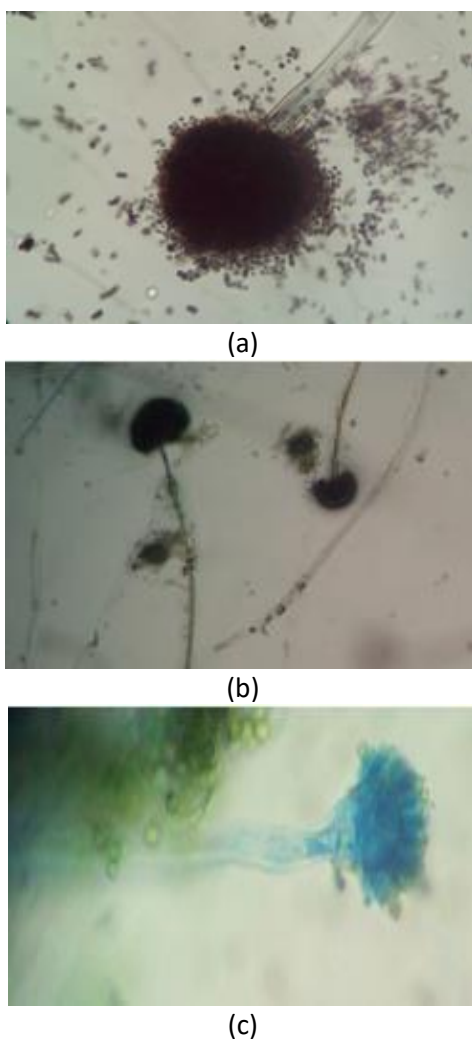
Há diversos modos dos fungos espalharem-se na natureza: através o ar atmosférico, da água, por intermédio de insetos, do homem, de outros animais. Isso

faz com que em cada localidade sejam encontradas linhagens e concentrações diferentes de fungos.<sup>22</sup> Interessa, pois, a pesquisa que permita a identificação e a caracterização destas linhagens naturais, as quais podem apresentar interessantes possibilidades biotecnológicas.

Posteriormente, a partir dos respectivos cultivos, foi realizada a identificação automatizada por inoculação no painel YEAST-ID do Sistema VITEK (BioMérieux), seguindo a técnica preconizada pelo fabricante. Ensaio de identificação de leveduras revelaram a significativa presença da *Saccharomyces cerevisiae* (99 %) e das espécies *Geotrichum Capitatum*, *rototheca zopfii* e *Candida Krusei* (1 %).



**Figura 3.** 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



**Figura 4.** Imagens dos fungos: (a) *Aspergillus niger*, (b) *Rhizopus oryzae*, e (c) *Aspergillus flavus*, obtidas por microcultivo em SDA. Nível de magnificação 400X

**Quadro 1.** Resultado da identificação de levedura, sendo o laudo positivo para a espécie *Saccharomyces cerevisiae*

INO	GLY	RAF	CEL	GAL	XYL	XLT	ERY	LAC	ARA	DUL	MEL
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADO	MLT	MLZ	GLU	AMG	NAG	SOR	NIT	TER	SUC	URE	48h
-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+

Notas: Maltose-MLT; Rafinose-RAF; Meleziose-MLZ; Glucose-GLU; Glycerol-GLY; Arabinose-ARA; Xilose-XYL; Adonitol-ADO; Xylitol-XLT; Galactose-GAL; Inositol-INO; Sorbitol-SOR; N-acetyl-glucosamine-NAG; Lactose-LAC; Sacharose- SUC; Urease-URE; Celubiose-CEL; Nitrato-NIT; Amygdalina-AMG; Trealose-TER; Melibiose-MEL; Dulcitol-DUL; Erytritol-ERY

### 3.2. Sacarificação

Na Tabela 1 estão apresentados os resultados da produção de glicose a partir das sacarificações realizadas pelas três linhagens das cepas *A.niger*, *A. flavu* e *R. oryzae*, individualmente e em conjunto.

Observa-se que para todos os tempos investigados, a produção de glicose foi superior para a *R. oryzae*. Durante a realização do experimento foi nítida também a redução considerável da viscosidade do mosto de *R. oryzae* e da *A. flavus*, em relação ao observado no mosto para a espécie *A. niger*.



**Tabela 1.** 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
<i>Mistura dos esporos</i>	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 30°C, 72 h de sacarificação; pH 5,0; 5,0 % de fécula de mandioca, 10 % de KNO<sub>3</sub>. A porcentagem de KNO<sub>3</sub> foi calculada em relação à quantidade de fécula de mandioca

Misturando os esporos dos fungos, a semelhança do que ocorre no processo artesanal em que os beijos participam com toda a microbiota coletada, o rendimento da sacarificação não foi expressivo, sugerindo que o isolamento e a produção de inóculos é um caminho viável para o aumento do rendimento do processo, além da qualidade, pela melhor uniformização dos secundários.

A maior atividade enzimática observada, para todos os tempos investigados, foi da cepa *R. oryzae*. 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.<sup>23,24</sup> Entretanto, neste trabalho

tem-se que levar em consideração o fato de todas as cepas estudadas foram selvagens.

### 3.3. Rendimento do processo de sacarificação

O fator de conversão relaciona a quantidade de glicose produzida com a quantidade consumida de amido. A Tabela 2 apresenta os ensaios realizados e os 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 50 g/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 %.

**Tabela 2.** Rendimento do processo de Sacarificação de uma suspensão de amido 50 g/L após 192 h 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

Para fins de comparação, na Tabela 3 estão apresentados alguns rendimentos de sacarificação encontrados na literatura.

Pode-se considerar, portanto, que os resultados encontrados nesta pesquisa, ainda que levemente inferiores aos melhores rendimentos relatados pela literatura, mostram um ótimo rendimento de

sacarificação pela espécie nativa *R. oryzae*. 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.

**Tabela 3.** Rendimento do processo de Sacarificação encontrado por autores que utilizaram o amido como matéria prima

Enzimas utilizadas	Rendimento da Sacarificação (%)
FORILASE NTL <sup>25</sup>	80
Termamyl 120L e AMG 300L <sup>26</sup>	97,49
Enzimas da batata doce <sup>27</sup>	26
Farelo emborolado <sup>28</sup>	80-85
Enzimas $\alpha$ -amilase e glucoamilase <sup>29</sup>	80,7

#### 4. Conclusão

O processo artesanal de produção da tiquira, bebida destilada obtida a partir da sacarificação e simultânea fermentação da mandioca, requer e permite melhoras, atenuando ou até mesmo evitando defeitos graves de produção, a exemplo dos elevados teores de carbamato de etila. Diversas bactérias foram encontradas nos beijos e 3 fungos filamentosos foram identificados: *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Rhizopus oryzae*, além da levedura *Saccharomyces cerevisia*. Estes fungos foram isolados, definido o melhor meio de cultura para os seus cultivos e avaliados enquanto agentes sacarificantes. O SDA apresentou as melhores condições para o crescimento das cepas, sendo apontado aqui como meio para o preparo de possíveis inóculos ou pés de cuba, reduzindo em muito o tempo de coleta de fungos e da sacarificação, além de propiciar maior

uniformidade nos teores e natureza dos secundários. Obteve-se uma quantidade máxima de glicose de 35,11 g/L para o *R. oryzae*. O rendimento da sacarificação atingiu uma produção máxima para a amostra de *R. oryzae*, obtendo um percentual de 78,02 %. Com este trabalho é possível afirmar que a utilização de esporos de *R. oryzae*, colhidos ao acaso, é alternativa viável para sacarificação do amido de mandioca.

#### Referências Bibliográficas

<sup>1</sup> Venturini Filho, W. G.; Mendes, B. P. Em: *Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas sul americanas*; Cereda, M. P.; Vilpoux, O. F., eds.; Fundação Cargill: São Paulo, 2003, cap. 19.

<sup>2</sup> Venturini Filho, W. G.; *Tecnologia de bebidas: matéria prima, processamento, BPF/APPCC legislação, mercado*, Edgard Blucher: São Paulo, 2005.

- <sup>3</sup> Arisseto-Bragotto, A. P.; Feltes, M. M. C.; Block, J. M. Food quality and safety progress in the Brazilian food and beverage industry: chemical hazards. *Food Quality and Safety* **2017**, *1*, 117. [[CrossRef](#)]
- <sup>4</sup> Tokpohozin, S. E.; Fischer, S.; Sacher, B.; Thomas Becker, T.  $\beta$ -D-Glucosidase as “key enzyme” for sorghum cyanogenic glucoside (dhurrin) removal and beer bioflavouring. *Food and Chemical Toxicology* **2016**, *97*, 217. [[CrossRef](#)]
- <sup>5</sup> Menezes, R. F.; Bergmann, A.; Aguiar, S. S. Alcohol consumption and the risk of cancer in Brazil: A study involving 203,506 cancer patients. *Alcohol* **2015**, *49*, 747. [[CrossRef](#)]
- <sup>6</sup> Lachenmeier, D. W.; Lima, M. C.; Nóbrega, I. C.; Pereira, J. A.; Kerr-Corrêa, F.; Kanteres, F.; Rehm, J. Cancer risk assessment of ethyl carbamate in alcoholic beverages from Brazil with special consideration to the spirits cachaça and tiquira. *BMC Cancer* **2010**, *8*, 10. [[CrossRef](#)]
- <sup>7</sup> Oliveira, B. F. R.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Goiás, Brasil, 2015. [[Link](#)]
- <sup>8</sup> Faia, A. M.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Lisboa, Portugal, 2011. [[Link](#)]
- <sup>9</sup> Sidrim, J. J. C.; Moreira, J. L. B.; *Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica*. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 1999.
- <sup>10</sup> Higashi, C. M.; Takashina, F. H.; Rechenchoski, D. Z.; Abe, A. T. S.; Vespero, E. C.; Quesada, R. M. B.; Pelisson, M. Comparação do sistema de identificação automatizado Vitek 2 e PCR-ITS para caracterização das espécies dos isolados clínicos de *Candida* spp. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde* **2015**, *36*, 233. [[CrossRef](#)]
- <sup>11</sup> Pinheiro, Z. B.; Rodrigues, K.; Pessoa-Wanderley, C. R.; Araújo, R. S.; Marinho, G. Remoção biológica de fenol por uso de reator contínuo com inóculo de *Aspergillus niger*. *Engenharia Sanitária de Ambiental* **2010**, *15*, 47. [[CrossRef](#)]
- <sup>12</sup> Reinehr, C. O.; Rizzardi, J.; Silva, M. F.; Oliveira, D.; Treichel, H.; Colla, L. M., Produção de lipases de *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* através de fermentação em estado sólido, avaliação da especificidade do substrato e seu uso em reações de esterificação e alcoólise. *Química Nova* **2014**, *37*, 454. [[CrossRef](#)]
- <sup>13</sup> Lacaz, C. S.; Porto, E.; Martins, J. E. C.; Heins-Vaccari, E. M.; Melo, N. T.; *Tratado de Micologia Médica*, 9a ed., Sarvier: São Paulo, 2002.
- <sup>14</sup> Spier, M. R.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal Paraná, Brasil, 2005. [[Link](#)]
- <sup>15</sup> Lehninger, A. G.; Nelson, D. L.; Cox, M. M.; *Princípios da Bioquímica*, 3a. ed., Savier: São Paulo, 2002.
- <sup>16</sup> Silva, R. N.; Monteiro, V. N.; Alcanfor, J. D. X.; Assis, E. M.; Asquieri, E. R. Comparison methods for the determination of reducers sugars and total in honey. *Food Science and Technology*. **2003**, *23*, 337. [[CrossRef](#)]
- <sup>17</sup> Saito, I. M.; Cabello, C. Produção de etanol a partir de hidrolisado obtido por tratamento hidrotérmico de farelo de mandioca. *Revista Energia na Agricultura*, **2006**, *21*, 34. [[Link](#)]
- <sup>18</sup> Almeida, P. Z., Pereira, M. G., Carvalho, C. C., Heinen, P. R., Ziotti, L. S., Messias, J. M., Jorge, J. A., & Polizeli, M. de L. T. M. Bioprospection and characterization of the amyolytic activity by filamentous fungi from Brazilian Atlantic Forest. *Biota Neotropica* **2017**, *17*, 1. [[CrossRef](#)]
- <sup>19</sup> Manera<sup>1</sup>, A. P.; Meinhardt, S.; Kalil, S. J. Purificação de amiloglicosidase de *Aspergillus niger*. *Semina: Ciências Agrárias* **2011**, *32*, 651. [[CrossRef](#)]
- <sup>20</sup> Callegari, S. G.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil, 2011. [[Link](#)]
- <sup>21</sup> 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* **1982**, *60*, 1. [[Link](#)]
- <sup>22</sup> Mezzari, A.; Perin, C.; Santos Júnior, Sidnei, A.; Bernd, L. A. G.; Di Gesu, G. Os fungos anemófilos e sensibilização em indivíduos atópicos em Porto Alegre RS. *Revista da Associação Médica Brasileira* **2003**, *49*, 270. [[CrossRef](#)]

- <sup>23</sup> Bastos, F. A.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Maranhão, Brasil, 2013. [[Link](#)]
- <sup>24</sup> Teixeira, C. G. Produção de álcool de mandioca, utilização de bolores na sacarificação do amido. *Bragantia*. **1950**, *10*, 277. [[CrossRef](#)]
- <sup>25</sup> A. L. Toledo, JB Severo Jr, RR Sousa, ES Campos, JJC Santana, EB Tambourgi. Purificação por adsorção expandida em leito e caracterização de alfa-amilases forilase ntl de *A. niger*. *Journal of Chromatography B* **2017**, *846*, 51. [[CrossRef](#)]
- <sup>26</sup> Neves, V. J. M.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual Paulista, Brasil, 2004. [[Link](#)]
- <sup>27</sup> Augustini, D.; Zanela, J.; Zorel, H. E.; Cunha, M. A. A.; *Resumos do XVI Encontro de Química da Região Sul*, Pato Branco, Brasil, 2008.
- <sup>28</sup> Banzon, J.; Fulmer, E. I.; Underkofler, L. A. Fermentative utilization of cassava. The production of ethanol. *Iowa State College Jour* **1949**, *23*, 219. [[PubMed](#)]
- <sup>29</sup> Ejiiofor, 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* **1996**, *18*, 519. [[CrossRef](#)]