

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

ESTUDO COMPARATIVO DA PRODUÇÃO DE
ÁLCOOL ETILICO A PARTIR DE VARIOS
AMIDOS EMPREGANDO PROCESSO COM
OU SEM COZIMENTO.

Balbina Cruz de Cantu
QUÍMICO INDUSTRIAL

Orientador:

Dr. YONG KUN PARK

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e
Agrícola da Universidade Estadual de Campinas, para obten
ção do Título de Mestre em "Tecnologia de Alimentos".

Campinas

1982

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

A meu esposo Denis e meu filho
Denisinho, com amor e carinho.

A meus pais e irmãos.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Yong Kun Park pela sua orientação na preparação deste trbalho.

Ao Consejo Nacional de Ciencia e Tecnología, México, pela bolsa de estudo fornecida.

À Universidad Veracruzana por todo o apoio fornecido para minha formação.

À Associação Nacional de Universidades e Institutos de Enseñanza Superior, México, pela ajuda econômica.

À Hélia Harumi Sato e Célia T. Zenin, colegas e amigas pela sua valiosa ajuda na realização deste trabalho.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE QUADROS	ix
RESUMO	xi
SUMMARY	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3. MATERIAIS	12
3.1. Equipamentos	12
3.2. Reagentes químicos	13
3.3. Microrganismos	13
4. MÉTODO	14
4.1. Produção de amiloglucosidase	14
4.2. Produção de α -amilase bacteriana	14
4.2.1. Preparação do meio de cultura	14
4.2.2. Preparação de α -amilase bacteriana	15
4.3. Produção de celulase	15
4.4. Determinação da atividade enzimática	16
4.4.1. Determinação da atividade de amiloglu- cosidase	16

4.4.2. Determinação da atividade de α -amilase bacteriana	17
4.4.3. Determinação da atividade de celulase	18
4.5. Determinação da concentração de álcool etílico	19
4.6. Determinação de açúcares redutores em mosto fermentado	19
4.7. Produção de álcool etílico a partir de vários tipos de amido	20
4.7.1. Produção de álcool etílico a partir de vários amidos, através do processo com cozimento	20
4.7.2. Produção de álcool etílico a partir de vários amidos, através do processo sem cozimento	21
4.8. Estudo da relação entre o tempo e a fermentação alcoólica de vários amidos	22
4.8.1. Estudo da relação entre o tempo e a fermentação alcoólica de vários amidos, através do processo com cozimento	22
4.8.2. Estudo da relação entre o tempo e a fermentação alcoólica de vários amidos, através do processo sem cozimento	23
4.9. Estudo da produção de etanol a partir de farinha de babaçú, através do processo com ou sem cozimento e sem ou com celulase de <u>Trichoderma viride</u> QM 9414 na mistura de fermentação	23

4.9.1. Estudo da produção de etanol a partir de farinha de babaçú, através do processo com cozimento, sem ou com celulase de <u>Trichoderma viride</u> QM 9414 na mistura de fermentação	23
4.9.2. Estudo da produção de etanol a partir de farinha de babaçú, através do processo sem cozimento, sem ou com celulase de <u>Trichoderma viride</u> QM 9414 na mistura de fermentação	24
4.10. Estudo da produção de etanol a partir de farinha de babaçú, empregando celulase de <u>Trichoderma viride</u> QM 9414	24
5. RESULTADOS	25
5.1. Produção de amiloglucosidase	25
5.2. Produção de α -amilase bacteriana	25
5.3. Produção de álcool etílico a partir de vários amidos	25
5.3.1. Produção de álcool etílico a partir de vários amidos, através do processo com cozimento	26
5.3.2. Produção de álcool etílico a partir de vários amidos, através do processo sem cozimento	27
5.4. Estudo da relação entre o tempo e a fermentação alcoólica de vários amidos	27

5.4.1. Estudo da relação entre o tempo e a fermentação alcoólica de vários <u>am</u> idos, através do processo com cozimen <u>to</u>	28
5.4.2. Estudo da relação entre o tempo e a fermentação alcoólica de vários <u>am</u> idos, através do processo sem cozimen <u>to</u>	29
5.5. Estudo da produção de etanol a partir de fa <u>rin</u> ha de baba <u>q</u> ũ, empregando os processos com ou sem cozimento, sem ou com celulase de <u>Trichoderma viride</u> QM 9414 na mistura de fermentação	30
5.5.1. Estudo da produção de etanol a par <u>tir</u> de farinha de baba <u>q</u> ũ, empregando o processo com cozimento e sem ou com celulase na mistura de fermenta <u>ç</u> ão	30
5.5.2. Estudo da produção de etanol a par <u>tir</u> de farinha de baba <u>q</u> ũ, empregando processo sem cozimento e sem ou com celulase na mistura de fermentação	31
5.6. Estudo da produção de etanol a partir de farinha de baba <u>q</u> ũ, empregando celulase de <u>Trichoderma viride</u> QM 9414	31
6. DISCUSSÃO	33
6.1. Produção de amiloglucosidase	33

	Página
6.2. Produção de α -amilase bacteriana	33
6.3. Produção de álcool etílico a partir de vários amidos sem ou com cozimento	34
6.4. Estudo da relação entre o tempo e a fermentação alcoólica de vários amidos com ou sem cozimento	35
6.5. Estudo da produção de etanol a partir de farinha de babaçú, através do processo com ou sem cozimento e sem ou com celulase de <u>Trichoderma viride</u> QM 9414 na mistura de fermentação.	36
6.6. Estudo para a produção de etanol em farinha de babaçú, empregando celulase de <u>Trichoderma viride</u> QM 9414	37
7. CONCLUSÃO	58
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

- FIGURA 1 - Estudo da relação entre o tempo e a fermenta
ção alcoólica de vários amidos, com cozimen
to, empregando α -amilase bacteriana e amilo
glucosidase de Aspergillus niger 38
- FIGURA 2 - Estudo da relação entre o tempo e a fermenta
ção alcoólica de vários amidos, com cozimen
to, empregando α -amilase bacteriana e amilo
glucosidase comercial (Diazyme) 39
- FIGURA 3 - Estudo da relação entre o tempo e a fermenta
ção alcoólica de vários amidos, com cozimen
to, empregando α -amilase bacteriana e amilo
glucosidase de Aspergillus awamori NRRL 3112 40
- FIGURA 4 - Estudo da relação entre o tempo e a fermenta
ção alcoólica de vários amidos, sem cozimen
to, empregando amiloglucosidase de Asper
gillus niger 41
- FIGURA 5 - Estudo da relação entre o tempo e a fermenta
ção alcoólica de vários amidos, sem cozimen
to, empregando amiloglucosidase comercial
(Diazyme) 42

- FIGURA 6 - Estudo da relação entre o tempo e a fermenta
ção alcoólica de vários amidos, sem cozimen
to, empregando amiloglucosidase de Asper
gillus awamori NRRL 3112 43
- FIGURA 7 - Estudo para a produção de etanol a partir de
farinha de babaçú, empregando celulase de
Trichoderma viride QM 9414 44
- FIGURA 8 - Comparação da % de produção de etanol a par
tir de vários amidos, utilizando-se amiloglu
cosidase de Aspergillus niger nos processos
de fermentações com cozimento, e sem cozimen
to 45
- FIGURA 9 - Comparação da % de produção de etanol a par
tir de vários amidos, utilizando-se amiloglu
cosidase de Aspergillus awamori NRRL 3112
nos processos de fermentações com cozimento
e sem cozimento 46
- FIGURA 10- Comparação da % de produção de etanol a par
tir de vários amidos, utilizando-se amiloglu
cosidase comercial nos processos de fermenta
ções com cozimento, e sem cozimento 47

FIGURA 11 - Sistema usado na fermentação alcoólica

48

ÍNDICE DE QUADROS

Página

QUADRO 1 - Produção de álcool etílico a partir de vários amidos com cozimento, empregando α -amilase bacteriana e amiloglucosidase de <u>Aspergillus niger</u>	49
QUADRO 2 - Produção de álcool etílico a partir de vários amidos com cozimento, empregando α -amilase bacteriana e amiloglucosidase comercial (Diazyme)	50
QUADRO 3 - Produção de álcool etílico a partir de vários amidos com cozimento, empregando α -amilase bacteriana e amiloglucosidase de <u>Aspergillus awamori</u> NRRL 3112	51
QUADRO 4 - Produção de álcool etílico a partir de vários amidos através do processo sem cozimento, empregando amiloglucosidase de <u>Aspergillus niger</u>	52
QUADRO 5 - Produção de álcool etílico a partir de vários amidos através do processo sem cozimento, e empregando amiloglucosidase comercial (Diazyme)	53

- QUADRO 6 - Produção de álcool etílico a partir de vários amidos, através do processo sem cozimento e empregando amiloglucosidase de Aspergillus awamori NRRL 3112 54
- QUADRO 7 - Produção de álcool etílico a partir de farinha de babaçú através do processo com cozimento, sem ou com celulase e empregando α -amilase bacteriana e amiloglucosidase de Aspergillus awamori NRRL 3112 55
- QUADRO 8 - Produção de álcool etílico a partir de farinha de babaçú, através do processo sem cozimento, sem ou com celulase e empregando α -amilase bacteriana e amiloglucosidase de Aspergillus awamori NRRL 3112 56
- QUADRO 9 - Estudo da produção de álcool em farinha de babaçú, empregando celulase de Trichoderma viride QM 9414 57

RESUMO

Na presente investigação, a eficiência da fermentação alcoólica foi comparada determinando-se o rendimento de etanol a partir de mostos de vários amidos com cozimento e sem cozimento. Neste estudo foram utilizados amido de milho, batata, mandioca e farinha de babaçú. As enzimas de Bacillus subtilis NRRL B-941 foram usadas como agentes de liquefação do amido. Farelo fúngico de Aspergillus awamori NRRL 3112 e de Aspergillus niger foram utilizados como agentes sacarificantes. A celulase foi preparada pela fermentação de Trichoderma viride QM 9414 em meio sólido.

O processo de fermentação alcoólica com cozimento consiste em liquefação do amido com α -amilase bacteriana de Bacillus subtilis NRRL B-941 pelo aquecimento a 85°C, sacarificação utilizando-se amiloglucosidase de Aspergillus awamori NRRL 3112 ou de Aspergillus niger isolado do beijú ou amiloglucosidase comercial (Diazyme) e fermentação pela Saccharomyces cerevisiae.

O processo de fermentação sem cozimento consiste em um processo de uma etapa na qual são combinadas a sacarificação e a fermentação.

Os resultados comparativos do rendimento de álcool etílico, obtidos dos mostos de amido nos processos com cozimento e sem cozimento, estão descritos a seguir.

No processo sem cozimento, obteve-se maior rendimento de etanol a partir de amido de milho (94,3%), enquanto que, a partir de amido de mandioca, este foi ligeiramente menor (81,0%). O rendimento de etanol a partir de farinha de babaçú foi de 55,9% e, a partir de amido de batata, 11,7%, sendo este último o menor valor obtido.

No processo com cozimento, no qual a fermentação alcoólica é realizada com amido cozido e liquefeito com α -amilase bacteriana, foram obtidos os seguintes rendimentos de etanol: 93,7% para amido de milho; 87,2% para amido de mandioca; 87,6% para amido de batata e 64,7% para amido de babaçú.

Não houve diferença significativa no rendimento de etanol a partir de amido de milho e de mandioca com cozimento e sem cozimento.

No caso de batata houve diferença marcante no rendimento de etanol entre amido com cozimento e sem cozimento e para a farinha de babaçú a diferença foi razoável.

A ação da celulase de Trichoderma viride QM 9414 foi também estudada durante a fermentação do amido e constatou-se que a enzima contribui para um aumento de 9,3% no rendimento de etanol.

SUMMARY

In the present investigation, the effectiveness of alcoholic fermentation was compared by measuring alcoholic yields from various starch mashes, both cooked and uncooked. Corn, potato, cassava starch, and raw babassu starch were used in this study. Enzymes from Bacillus subtilis NRRL B-941 were used as liquefying agent for starch. Mold bran of Aspergillus awamori NRRL 3112, Aspergillus niger, were used as a saccharifying agents. Cellulase was prepared by solid state fermentation of Trichoderma viride QM 9414.

The alcoholic fermentation process with cooking was as follows: starch was liquefied with bacterial α -amylase from Bacillus subtilis NRRL B-941 by heating to 85°C, and saccharified by amyloglucosidase from Aspergillus awamori NRRL 3112, Aspergillus niger isolated from beijū and Diazyme (Commercial amyloglucosidase), and fermented by Saccharomyces cerevisiae.

The alcoholic fermentation process without cooking consisted in one-step process in which are combined saccharification and fermentation.

Comparison of ethyl alcohol yields obtained from various starch mashes with or without cooking is as following. Alcohol yield from corn starch without cooking was the highest (94.3%), while cassava starch is only slightly lower (81.0%). Alcohol yields we

re 55.9% from raw babassu starch and 11.7% from potato starch which was lowest yield. The comparison of alcoholic fermentation was made between starch cooked and liquefied by bacterial α -amylase, were 93.7% for corn, 87.2% for cassava, 87.6% for potato and 64.7% for babassu. There is no significant difference in alcohol yields from cooked and uncooked corn and cassava starch. In the case of potato starch, there are remarkable differences in alcohol yields between cooked and uncooked. For babassu flour there are reasonable difference in alcohol yields between cooked and uncooked.

The action of cellulase of Trichoderma viride QM 9414 was also studied during fermentation of starch and it was demonstrated that addition of the enzyme increased 9.3% of ethanol yield.

1. INTRODUÇÃO

Em virtude da elevação dos preços dos derivados do petróleo verificada nos últimos anos, tem havido interesse dos pesquisadores em obter fontes alternativas de energia. Uma delas, já em uso no Brasil, é o etanol obtido da cana de açúcar que vem sendo usado como combustível.

Os estudos para a produção de xarope por enzimas amilolíticas têm sido muito intensos. Assim, a produção de xarope de milho através da liquefação do amido pela ação da α -amilase bacteriana, seguida da sacarificação até glicose pela amiloglucosidase fúngica, foi introduzida por Denault e Underkofler, Cadmus e colaboradores, em 1963. Posteriormente, numerosos estudos e investigações foram desenvolvidos utilizando outros materiais amiláceos para a produção de xarope de glicose.

A α -amilase bacteriana é uma endoenzima que hidrolisa α -1,4 ligações glicosídicas do amido, de modo aleatório produzindo dextrina, oligossacarídeos e pequena quantidade de glicose e maltose.

A amiloglucosidase é uma exoenzima e hidrolisa as ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6 do amido, sendo capaz de converter o amido até glicose.

O presente trabalho teve como objetivo comparar a produção de ál

cool etílico, a partir de amidos de milho, mandioca, batata e farinha de babaçú, através do processo com cozimento e sem cozimento.

No processo com cozimento foram empregadas α -amilase bacteriana para a liquefação do amido à temperatura de 85°C, amiloglucosidase para a sacarificação e Saccharomyces cerevisae para a fermentação alcoólica.

No processo sem cozimento foram empregadas somente amiloglucosidase e Saccharomyces cerevisae para a fermentação alcoólica, onde o processo é efetuado a 30°C e pH 3,5. Neste caso, evita-se a contaminação pelo baixo pH e poupa-se energia, já que a fermentação alcoólica é efetuada a 30°C.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Em 1942, Kerr e colab. (12) foram os primeiros pesquisadores a detectar a presença de amiloglucosidase em preparações comerciais de amilase fúngica.

Mais tarde, em 1947, Underkofler e colab. (35) descreveram um procedimento para a produção de agentes sacarificantes a partir de fungos. Uma cepa selecionada de Aspergillus oryzae era cultivada em farelo de trigo umedecido e o farelo fúngico assim preparado era utilizado da mesma maneira que o malte para a conversão de mosto em álcool.

Em 1948, Corman e Langlykke (5) pesquisaram a correlação da produção de álcool de mostos de milho sacarificados com filtrados de cultura de fungos. Verificaram que existia uma correlação mais estreita com a potência de um sistema de enzima glucogênica medida pela hidrólise de maltose do que com a potência de α -amilase fúngica. Os autores observaram variações na ação das enzimas glucogênica e da α -amilase. A α -amilase fúngica liquefazia o amido produzindo dextrina e maltose, enquanto que o sistema de enzima glucogênica hidrolisava a maltose, a dextrina e o amido, produzindo glicose.

Banzon e colab. (3), 1949, relataram que o rendimento na produção de álcool de mandioca, utilizando-se farelo fúngico para a conversão, era superior àquele obtido utilizando-se malte de cevada. Os autores obtiveram 80 a 85% de conversão de amido a etanol em relação ao teórico, utilizando-se farelo fúngico e 70% de conversão utilizando-se malte de cevada.

Teixeira e colab. (34), 1950, relataram que era possível obter 90% de conversão de amido de mostos de mandioca empregando-se preparações de cultura submersa de fungos. Os autores compararam a produção de álcool a partir de amido de mandioca utilizando farelo fúngico, malte de cevada e hidrólise ácida e obtiveram, respectivamente, 80 a 85%; 70 a 74% e 43 a 74% de conversão do amido a etanol. Os autores também empregaram malte de milho nas mesmas quantidades de malte de cevada, porém obtiveram resultados muito baixos.

Phillips e colab. (22, 23), 1951, estudaram a enzima de Rhizopus delemar que hidrolisava o amido em glicose, a qual denominaram glucoamilase.

Kerr e colab. (11), 1951, também pesquisaram uma enzima obtida de fungos que hidrolisava o amido em glicose, denominando-a α -1,4 amiloglucosidase.

Pool e Underkofler (20), em 1953, estudaram a produção de etanol utilizando farelos fúngicos obtidos da cultura de três linhagens de microrganismos em farelo de trigo.

O farelo fúngico de Aspergillus niger 330 apresentou alta atividade de maltase e baixa atividade de α -amilase.

O farelo obtido de Aspergillus niger 38B mostrou alta atividade de α -amilase e baixa atividade de maltase e limite dextrinase. O farelo fúngico de Aspergillus niger 337 possuía alta atividade de limite dextrinase e atividade intermediária de α -amilase e maltase. Os autores relataram que parecia existir uma ligeira correlação entre a produção de álcool e a atividade de maltase, não havendo correlação com as outras enzimas. Apesar disso, os níveis ótimos do agente sacarificante para a produção máxima de álcool não podia ser predito pela atividade de maltase.

Pazur e colab. (25, 24, 26), 1959, 1960 e 1962, purificaram a amiloglucosidase produzida por Aspergillus niger.

Houle e Goering (10), 1961, produziram xarope de glicose utilizando-se α -amilase bacteriana para a liquefação do amido de cevada e amilases fúngicas para a sacarificação.

Leach e Schoch (13), 1961, estudaram a estrutura do amido de milho e de batata pela ação enzimática. Estes amidos foram utilizados

devido às diferenças nas propriedades físicas e na organização grnular. Os autores verificaram que o grânulo de batata era muito mais resistente à ação das enzimas estudadas e, particularmente, à glucoamilase do que o grânulo de amido de milho. Conclusões similares foram obtidas por Balls e Schwemer (1), por Gates e Sandested e por Badenhuizen (9, 2).

Denault e colab. (7), 1963, foram os primeiros a introduzir a produção de xarope de milho por liquefação do amido por meio de α -amilase bacteriana, seguida pela sacarificação até glicose pela enzima fúngica amiloglucosidase, assim como Cadmus e colaboradores, em 1966 (6).

Smiley e colab. (30), 1964, pesquisaram a produção de amiloglucosidase de Aspergillus niger por fermentação submersa e a utilização dessa enzima na produção de glicose a partir de amido.

Em 1966, Lee e Whelan (14) relataram que a amiloglucosidase de Aspergillus niger era capaz de converter quantitativamente o amido e glicogênio em glicose. Mais tarde, em 1970, Marshall e Whelan (16) detectaram a presença de α -amilase na preparação de amiloglucosidade de Aspergillus niger e, por isso, tornaram a usar a preparação cristalina de Rhizopus niveus e verificaram que esta última preparação, livre de α -amilase, era incapaz de converter completamente o amido e glicogênio. A adulteração da amiloglucosidaa

se com α -amilase restabelecia a conversão a um nível quantitativo. Os autores concluíram que parece existir um obstáculo dentro da maioria das moléculas de glicogênio e amido que bloqueia efetivamente o progresso da amiloglucosidase. Esse obstáculo era transposto pela α -amilase, que era um contaminante da preparação de Aspergillus niger e que podia, presumivelmente, existir na preparação da amiloglucosidase que tinha sido usada na determinação quantitativa do amido e glicogênio.

Outro obstáculo para a ação da amiloglucosidase que poderia ser referido são as ligações α -1,3 do amido e glicogênio (8) que bloqueiam a enzima. Na hidrólise de amido da Flórida, que contém proporção relativamente alta de tais ligações (27), foi obtido o grau mais baixo de conversão entre os polissacarídeos testados (Marshall e Whelan, 1970).

Há, também, a possibilidade de modificação química dos resíduos de glicose durante o procedimento de isolamento (4) e também a presença de arranjos de ligações α -1,6 que atuam como obstáculos à ação da amiloglucosidase.

Saletan (31), 1968, relatou o método para a produção de álcool etílico a partir de milho, empregando amiloglucosidase fúngica.

Park e Papini (18), 1970. Estudaram a produção de xarope de glicose a partir de amido de mandioca pelo processo enzima-enzima em

pregando α -amilase bacteriana de Bacillus subtilis NRRL B-941 para a liquefação do amido e amiloglucosidase fúngica para sacarificação.

A amiloglucosidase foi produzida de Aspergillus niger NRRL 3112 e Aspergillus awamori NRRL 3112 que produzem alta atividade de amiloglucosidase e baixa atividade de transglucosidase.

Concluíram que, estando a temperatura ótima de atividade de amiloglucosidase situada entre 60 e 70°C, a conversão efetuada a 70°C foi incompleta devido à gradual inativação enzimática pelo tempo prolongado de incubação a essa temperatura.

Park e De Lima (21), 1972, selecionaram linhagens de fungos para maior produção de amiloglucosidase. Das 30 linhagens de fungos estudadas, apenas 7 mostraram-se capazes de produzir quantidades consideráveis, destacando-se o Aspergillus awamori NRRL 3112 e o Aspergillus awamori IAM 2330 que produziram quantidades significativas, enquanto que o Aspergillus niger NRRL 330, Aspergillus usami IAM 2186 e Aspergillus awamori 2330 foram menos eficientes.

Dessas sete linhagens, o Aspergillus awamori NRRL 3112 foi selecionado para a produção de amiloglucosidase por fermentação submersa e a enzima foi purificada usando-se coluna de DEAE-celulose.

Park e S. de Santi (17), 1977, obtiveram um mutante de Aspergillus awamori por meios químicos e físicos, que produzia grande quanti

dade de amiloglucosidase sem a formação de transglucosidase. O mutante, tratado com o composto N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina (mutante MNNG) e com luz ultravioleta (mutante MNNG-uv), produziu a mesma quantidade de amiloglucosidase da cepa original, mas o mutante tratado com MNNG e em seguida com ultravioleta produziu o dobro da quantidade de enzima em relação à cepa original.

Park e colab. (19), 1978, extraíram amido de babaçú por tratamento alcalino e estudaram algumas características pelo método enzimático, comparando-os com amido de milho e de mandioca. Verificaram que o amido de babaçú apresenta característica de viscosidade diferente em relação aos amidos de milho e de mandioca. Os autores também estudaram a solubilidade do amido granular em anidrido de dimetil sulfóxido usada como medida da susceptibilidade para a ação da α -amilase, como descrito por Leach e Schoch (1961, 1962), e obtiveram a seguinte ordem decrescente: amido de milho, amido de mandioca e amido de babaçú. Nas observações microscópicas dos grãnulos de amido submetidos à ação de anidrido de dimetil sulfóxido e α -amilase, verificaram que o amido de milho desenvolvia rápidamente um escurecimento do hilo e fragmentação progressiva dos grãnulos em anidrido de dimetil sulfóxido e também severa erosão dos grãnulos pela ação da α -amilase. Os amidos de babaçú e mandioca sofreram ligeiro ataque enzimático.

A capacidade de entumescimento mostrou a seguinte ordem decrescente: amido de mandioca, amido de babaçú e amido de milho.

Dos estudos da hidrólise de amido solubilizado ou gelatinizado por β -amilase e pululanase, os autores verificaram que há alguma relação entre a β -amilólise e a susceptibilidade à α -amilase e concluíram que o amido de babaçú apresenta cadeia de amilose maior em relação a outros amidos.

Ueda e colab. (36), 1981, estudaram a produção de etanol utilizando agentes sacarificantes e levedura, na qual as etapas da fermentação convencional foram combinadas em uma única etapa. Neste processo, os mostos de amido cru foram fermentados quase completamente, sem cozimento e sem autoclavagem, evitando-se a contaminação microbiológica devido ao pH baixo. Neste estudo, a mistura de mandioca triturada, preparação de amiloglucosidase comercial de Aspergillus niger e levedura foi fermentada durante 5 dias a 30°C. Os autores obtiveram máxima produção de etanol a partir das variedades de mandioca SRT-Taquari e SRT-59, com 83,3 e 99,6% de conversão, respectivamente. Utilizando a amiloglucosidase de Aspergillus awamori, a produção de etanol a partir da variedade de mandioca IAC-12.829 foi de 94,6%

Os autores verificaram uma redução considerável da viscosidade do mosto após um dia de fermentação, utilizando enzimas fúngicas do koji. A redução da viscosidade dos mostos fermentados foi de 40,8% e 93,0% utilizando amiloglucosidase comercial de Aspergillus awamori e Aspergillus niger, respectivamente.

Park e colab. (28), 1982, investigaram a microflora do beijú e suas características bioquímicas. O beijú é uma massa de mandioca fermentada naturalmente, utilizado para a preparação de tiquira que é uma bebida alcoólica tradicional indígena, produzida no estado do Maranhão. A tiquira é produzida em duas etapas: na primeira, a raiz de mandioca é lavada, triturada e o líquido extraído por pressão fazendo-se tortas de, aproximadamente, 40 cm de diâmetro e 2 a 3 cm de espessura. As tortas são cozidas e fermentadas naturalmente por cerca de 10 dias. Após fermentação, as massas apresentam fungos na superfície e são denominadas beijú. As enzimas amilolíticas necessárias para conversão de amido a açúcares fermentáveis são produzidas durante este estágio. No segundo estágio de fermentação, é adicionada água ao beijú triturado e a mistura é fermentada naturalmente por 2 a 3 semanas. A sacarificação e fermentação alcoólica do amido ocorrem simultaneamente durante este estágio.

Os fungos predominantes no beijú foram Aspergillus niger e Paecilomyces sp., sendo também encontrada quantidade moderada de Rhizopus sp., observando-se que Paecilomyces sp. produzia alta atividade de α -amilase, enquanto que Rhizopus delemar produzia pequena quantidade desta enzima. Por outro lado, Aspergillus niger e Rhizopus delemar produziram grande quantidade de amiloglucosidase, enquanto que Paecilomyces sp. e Neurospora sp. produziram pequenas quantidades desta enzima.

3. MATERIAIS

3.1. Equipamentos

- Rotary Shaker (agitador rotatório)
Fermentation Design INC
Allentown, P.A. 18103
- Espectrofotômetro Coleman 295
- Estufa para cultura bacteriológica
Olidef CZ, Ribeirão Preto - SP
- Balança analítica Sauter tipo 414/10
- Potenciômetro Horiba Analyser
Modelo H-5, Kioto - Japão
- Banho-maria modelo 110E
SOC. FABBE LTDA.
- Balança semi-analítica
Sauter tipo SD 2000 T/0,1
- Densímetro
- Microscópio Carl Zeiss 873

- Aparelho de destilação

- Vidraria em geral

3.2. Reagentes químicos

Carlo Erba e Baker

Amidos: amido de milho, mandioca, batata e farinha de babaçú

Enzimas: Amiloglucosidase comercial (Diazyme)

Miles laboratories, EUA

3.3. Microorganismos

Para a produção de enzimas foram utilizados os seguintes microrganismos: Aspergillus niger isolado do beijú (28) e Aspergillus awamori NRRL 3112 para a produção de amiloglucosidase; Trichoderma viride QM 9414 para a produção de celulase; Bacillus subtilis NRRL B-941 para a produção de α -amilase bacteriana e Saccharomyces cerevisiae (produto Fleischmann) para a fermentação alcoólica.

4. MÉTODOS

4.1. Produção de amiloglucosidase

Para a produção de amiloglucosidase de Aspergillus niger e de Aspergillus awamori NRRL 3112, os esporos foram inoculados separadamente, em 20 g de mistura de farelo de trigo: água na proporção 1:1 (p/v) contida em frascos Erlenmeyer de 500 ml, previamente esterilizados a 121°C por 30 minutos.

Os frascos foram incubados a 30°C por 72 horas e o farelo de trigo fermentado foi utilizado como fonte de enzima.

4.2. Produção de α -amilase bacteriana

A α -amilase bacteriana de Bacillus subtilis NRRL B-941 foi produzida de acordo com os itens descritos a seguir:

4.2.1. Preparação do meio de cultura

A mistura de 160 ml de amido liquefeito, 10 ml de hidrolisado de farinha de soja, 2 ml de álcool etílico, 2,6 g de fosfato de amônio dibásico, 0,04 g de sulfato de magnésio e 0,04 g de cloreto de potássio, foi ajustada para pH 7,0 e o volume completado para 200 ml, com amido liquefeito. Em seguida, a mistura foi adicionada a 100 g de farelo de trigo. Uma quantidade de 40 g de meio de cultura foram distribuídos em frascos de Erlenmeyer de 500 ml e esterilizados a 121°C por 20 min.

O hidrolisado de soja foi preparado pelo aquecimento de 5 g de farinha de soja desengordurada em 100 ml de NaOH 0,1%, em banho-maria, por uma hora.

Para a preparação de amido liquefeito, uma suspensão 3% de amido em água desionizada e 0,15 g de farelo contendo 300 unidades de atividade de α -amilase de Bacillus subtilis NRRL B-941, ajustada a pH 6,0, foi incubada a 80°C durante 30 minutos, com agitação.

4.2.2. Preparação de α -amilase bacteriana

Para a preparação de α -amilase bacteriana, o Bacillus subtilis NRRL B-941 foi inoculado em frascos de Erlenmeyer de 500 ml contendo 40 g de meio de cultura preparado como descrito acima. Após a incubação a 35°C por 48 - 72 horas, o meio de cultura foi seco ao ar à temperatura ambiente, triturado e utilizado como fonte de α -amilase bacteriana.

4.3. Produção de celulase

Para a produção de celulase, esporos da linhagem de Trichoderma viride QM 9414 foram inoculados em 20 g de mistura farelo de trigo, água na proporção 1:1 (p/v), contido em frascos Erlenmeyer de 500 ml, previamente esterilizados a 121°C por 30 minutos. Após incubação por 72 horas a 30°C, o meio de cultura foi utilizado como fonte de celulase.

4.4. Determinação da atividade enzimática

4.4.1. Determinação da atividade de amiloglucosidase

A determinação da atividade de amiloglucosidase (15) é baseada na quantidade de glicose formada em uma mistura da solução enzimática e amido após a incubação por uma hora a 60°C, sendo a quantidade de glicose determinada pelo método de Somogyi-Nelson (33).

Para a determinação da atividade de amiloglucosidase no farelo fúngico, produzido de acordo com o item 4.1, uma amostra de 10 g de farelo fúngico foi adicionada em 100 ml de água desionizada e deixada em maceração por uma hora, com agitações a intervalos regulares. Após filtração em lã de vidro, a atividade enzimática do extrato foi determinada como descrita a seguir:

Uma amostra de 1 ml foi adicionada em balão volumétrico de 100ml contendo 50 ml de solução de amido 4% em tampão acetato 0,06M pH 4,2. Após uma hora de incubação a 60°C, a reação enzimática foi interrompida pela adição de quantidade suficiente de solução de hidróxido de sódio 2N até a neutralização da mistura de reação, usando como indicador 2 gotas de fenolftaleína em 0,1% de etanol. Em seguida, o balão volumétrico foi resfriado em água corrente e o volume completado com água destilada. Como controle, foi feita uma amostra sem incubação a 60°C; 1 ml da amostra foi adicionado ao balão volumétrico contendo substrato e a reação foi imediatamente interrompida pela neutralização da mistura de reação.

Uma unidade de atividade de amiloglucosidase significa que 1 g de glicose é formada a partir de amido pH 4,2, durante uma hora de incubação a 60°C.

4.4.2. Determinação da atividade de α -amilase bacteriana

A determinação da atividade de α -amilase (32) é baseada na medida do tempo requerido para hidrolisar o amido a um tamanho definido de dextrina indicado pela cor do complexo dextrina a 30°C por uma solução diluída de iodo, sendo essa cor comparada com uma solução de coloração padrão constituída de 25 g de cloreto de cobalto hexaidratado, 3,84 g de dicromato de potássio em 100 ml de ácido clorídrico 0,01N (32).

Para a determinação da atividade de α -amilase bacteriana produzida de acordo com o item 4.2.2, 40 g de meio de cultura fermentado foram adicionados a 100 ml de água desionizada e deixados em maceração por uma hora com agitações a intervalos regulares. Após filtração em lã de vidro, a atividade enzimática foi determinada da seguinte maneira: para a determinação da atividade da α -amilase, 1 ml da amostra foi adicionado à mistura de 20 ml de solução de amido 2% em tampão acetato 0,1M, pH 6,0 e 9 ml de água. A mistura da reação foi incubada a 30°C em banho-maria termostatizado. Periodicamente, 1 ml da mistura de reação foi adicionado a tubos de ensaio contendo 5 ml de solução diluída de iodo-KI até obtenção de uma coloração igual à solução padrão de CoCl_2 e $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ em HCl 0,01N.

Solução diluída de Iodo-KI:

2 ml de solução estoque de Iodo (11 g de KI e 5,5 g de Iodo em 500 ml de água) e 20 g de KI foram dissolvidos em 500 ml de Iodo.

A atividade da α -amilase foi determinada a partir de uma curva padrão previamente obtida usando-se α -amilase de potência conhecida. A atividade em unidades foi traçada contra o tempo de dextrinização em minutos.

Uma unidade de atividade de α -amilase é definida como a quantidade de enzima que dextriniza 1 g de amido solúvel em uma hora, a 30°C.

4.4.3. Determinação da atividade de celulase

A determinação da atividade de celulase tem como base medir a quantidade de açúcares redutores expressos como glicose, liberados de carboximetilcelulose (CMC-Na), sob as condições do ensaio (29).

Para a determinação da atividade de celulase no meio de cultura produzido de acordo com o item 4.3., 10 g de meio de cultura foram adicionados em 100 ml de água destilada e deixados em maceração por uma hora, com agitações a intervalos regulares. Após filtração em lã de vidro, determinou-se a atividade enzimática tomando-se uma alíquota de 0,9 ml de enzima e adicionando-se a um balão volumétrico de 25 ml contendo 0,1 ml de solução 0,625% de carboximetilcelulose (sal sódico) em tampão citrato 0,5M pH 4,5 e incubando-se essa mis

tura de reação a 40°C, por 30 minutos. Após incubação, a concentração de açúcares redutores foi determinada pelo método de Somogyi-Nelson (33). Para controle, foi determinada a concentração de açúcares redutores na mistura de reação no tempo zero de incubação.

Uma unidade de atividade de celulase foi definida como a quantidade de enzima que produz 1 mg de açúcar redutor, nas condições do ensaio.

4.5. Determinação da concentração de álcool etílico

Após a fermentação completa dos mostos, uma amostra de 200 ml de mosto foi destilada até obtenção de um volume de 100 ml. A porcentagem de álcool(p/v) no destilado foi determinada medindo-se a densidade e a temperatura do destilado e corrigindo-se os valores para densidade a 15°C, por meio de tabelas.

4.6. Determinação de açúcares redutores em mosto fermentado

Para a determinação da quantidade de açúcares redutores que não foram hidrolisados e fermentados, uma alíquota de 10 ml de mosto fermentado foi hidrolisada com 10 ml de ácido sulfúrico 2N, durante 3 horas, em banho-maria em ebulição. O hidrolisado foi neutralizado com bicarbonato de sódio e a concentração de açúcares redutores foi determinada pelo método de Somogyi-Nelson (33).

4.7. Produção de álcool etílico a partir de vários tipos de amido

Foram utilizados os seguintes amidos: milho, mandioca, batata e farinha de babaçú.

4.7.1. Produção de álcool etílico a partir de vários amidos, através do processo com cozimento

O processo convencional para a conversão de amido a etanol consiste de autoclavagem, liquefação, sacarificação, fermentação alcoólica e destilação.

Pesou-se quantidade de amido correspondente a 20 g de açúcares reductores em frascos Erlenmeyer de 500 ml e adicionou-se 170 ml de água destilada. A suspensão foi agitada a intervalos regulares durante uma hora. Ajustou-se o pH da suspensão para 6,0 com NaOH 10% e HCl 10%, fez-se a liquefação do amido com 0,5 g de α -amilase de Bacillus subtilis NRRL B-941 contendo 1000 unidades de atividade, aquecendo-se a suspensão até 80°C com agitação rigorosa. A temperatura da mistura de reação foi mantida a 80°C durante 30 minutos até a liquefação total do amido, e em seguida, a amostra foi resfriada a 30°C.

A seguir, foram adicionados 10 g de amiloglucosidase (farelo de trigo fermentado) de Aspergillus awamori NRRL 3112 ou Aspergillus niger contendo 5,63 e 1,06 unidades de atividade por grama, respectivamente, preparados de acordo com o item 4.1. No caso da amiloglucosidase comercial (Diazyme), utilizou-se 2,8 g de enzima cor

respondente a 69,4 unidades de atividade. Adicionou-se também 6 ml de suspensão de levedura 15% (p/v) e o pH da amostra foi ajustado para pH 3,5 com ácido sulfúrico 10%. Imediatamente após, os frascos foram fechados com um dispositivo de vidro em forma de U (fig. 11) contendo ácido sulfúrico concentrado, incubados a 30°C e agitados periodicamente. Através deste dispositivo somente o CO₂ pode passar, o vapor de água é absorvido pelo ácido sulfúrico, sendo que a perda de peso do conteúdo representa a formação de CO₂. Após a fermentação completa, os mostos foram destilados e o conteúdo alcoólico foi determinado medindo-se a gravidade específica como descrito no item 4.5.

A quantidade de açúcares que não foram hidrolisados e fermentados foi determinada de acordo com o item 4.6.

4.7.2. Produção de álcool etílico a partir de vários amidos através do processo sem cozimento

No processo de fermentação não convencional o álcool é obtido a partir de amido cru em apenas uma etapa, onde todos os processos de liquefação, sacarificação e fermentação alcoólica são combinados (36).

Pesou-se a quantidade de amido correspondente a 20 g de açúcares redutores em frascos Erlenmeyer de 500 ml, adicionou-se 170 ml de água destilada e agitou-se a suspensão a intervalos regulares, durante uma hora. Em seguida, adicionou-se 20 g de amiloglicosidase (farelo de trigo fermentado) proveniente de Aspergillus awa

mori NRRL 3112 ou Aspergillus niger contendo 5,63 e 1,06 unidades de amiloglucosidase por grama, respectivamente, preparados de a acordo com o item 4.1.

No caso de amiloglucosidase comercial (Diazyme), utilizou-se 2,8g de enzima correspondente a 69,4 unidades de amiloglucosidase.

Adicionou-se também 6 ml de suspensão de levedura 15% (p/v) e a justou-se o pH da mistura para pH 3,5 com ácido sulfúrico 10%.

Em seguida, os frascos foram fechados com o dispositivo em U (fig. 11) contendo ácido sulfúrico concentrado, incubados a 30°C e agi tados periodicamente. Após a fermentação completa, os mostos fo ram destilados e o conteúdo alcoólico foi determinado como descri to no item 4.5. A quantidade de açúcares que não foram hidrolisa dos e fermentados foi determinada de acordo com o item 4.6.

4.8. Estudo da relação entre o tempo e a fermentação alcoólica de vários amidos

O estudo da relação entre o tempo e a fermentação alcoólica foi realizado através da medida da formação de CO₂ (g), com o decor rer do tempo (horas).

4.8.1. Estudo da relação entre o tempo e a fermentação alcoó lica de vários amidos, através do processo com cozi mento

Este estudo foi realizado de acordo com o item 4.7.1, onde o sis

tema de fermentação foi pesado a intervalos de tempo em horas e a diferença de peso representou o peso de CO_2 produzido.

4.8.2. Estudo da relação entre o tempo e a fermentação alcoólica de vários amidos, através do processo sem cozimento

O estudo foi realizado de acordo com o item 4.7.2. A fermentação foi acompanhada pela medida da formação de CO_2 a intervalos de tempo em horas, onde a diferença de peso representou o peso de CO_2 produzido.

4.9. Estudo da produção de etanol a partir de farinha de babaçú, através do processo com ou sem cozimento e sem ou com celula se de Trichoderma viride QM 9414 na mistura de fermentação

O estudo foi realizado utilizando-se 20 g de amiloglucosidase (farelo fúngico) de Aspergillus awamori NRRL 3112 correspondente a 112,6 unidades de amiloglucosidase e 10 g de celulase de Trichoderma viride QM 9414 (farelo fúngico).

4.9.1. Estudo da produção de etanol a partir de farinha de babaçú, através do processo com cozimento, sem ou com celulase de Trichoderma viride QM 9414 na mistura de fermentação

O estudo foi realizado de acordo com o item 4.7.1, adicionando-se

10 g de celulase produzida de acordo com o item 4.3, antes de se ajustar o pH da mistura de reação para pH 3,5.

4.9.2. Estudo da produção de etanol a partir de farinha de babaçú, através do processo sem cozimento, sem ou com celulase de Trichoderma viride QM 9414 na mistura de fermentação

O estudo foi realizado de acordo com o item 4.7.2, adicionando-se 10 g de celulase produzida de acordo com o item 4.3, antes de se ajustar o pH da mistura de reação para pH 3,5.

4.10. Estudo da produção de etanol a partir de farinha de babaçú, empregando celulase de Trichoderma viride QM 9414

Pesou-se uma quantidade de farinha de babaçú correspondente a 20g de açúcares redutores e adicionou-se 170 ml de água desionizada, 10 g de celulase Trichoderma viride QM 9414 produzida de acordo com o item 4.3 e 6 ml de suspensão de levedura 15% (p/v). A mistura foi ajustada para pH 3,5 com ácido sulfúrico e o frasco foi fechado com o dispositivo de vidro, mostrado na figura 11, contendo ácido sulfúrico concentrado.

O frasco foi incubado a 30°C e agitado periodicamente. Após cinco dias de fermentação, o mosto foi destilado e o conteúdo alcoólico determinado pela gravidade específica como descrito no item 4.5.

A quantidade de açúcares redutores que não foram fermentados foi determinada de acordo com o item 4.6.

5. RESULTADOS

5.1. Produção de amiloglucosidase

Amiloglucosidase foi produzida de acordo com o item 4.1, onde se obteve os seguintes resultados:

Linhagem de Microrganismos	Unidades de amiloglucosidase/g de farelo de trigo fermentado
<u>Aspergillus niger</u>	1,06
<u>Aspergillus awamori</u> NRRL 3112	5,63
Amiloglucosidase comercial (Diazyme)	24,8 (por grama de Diazyme)

5.2. Produção de α -amilase bacteriana

A α -amilase de Bacillus subtilis NRRL B-941 foi produzida de acordo com o item 4.2, onde se obteve 2000 unidades/g de farelo de trigo fermentado.

5.3. Produção de álcool etílico a partir de vários amidos

A produção de álcool etílico a partir de amido de milho, mandioca,

batata e farinha de babaçú através dos processos com cozimento e sem cozimento foi realizada de acordo com os itens 4.7.1 e 4.7.2, respectivamente.

5.3.1. Produção de álcool etílico a partir de vários amidos, através do processo com cozimento

O quadro 1 mostra as porcentagens de conversão de amido a etanol através do processo com cozimento, utilizando-se α -amilase bacteriana e amiloglucosidase de Aspergillus niger. Foram obtidos 99,2%; 94,0%; 88,4% e 66,1% de conversão de amido de batata, milho, mandioca e farinha de babaçú para etanol, respectivamente.

O quadro 2 ilustra a conversão de amido a etanol através do processo com cozimento, utilizando-se α -amilase bacteriana e amiloglucosidase comercial (Diazyme). Foram obtidos 97,9%; 90,6%; 87,9% e 66,6% de conversão de amido de milho, batata, mandioca e farinha de babaçú, para etanol, respectivamente.

Na conversão de amido a etanol através do processo com cozimento utilizando-se α -amilase bacteriana e amiloglucosidase de Aspergillus awamori NRRL 3112 foram obtidos 89,3%, 85,2%; 73,1% e 61,2% de conversão de amido de milho, mandioca, batata e farinha de babaçú, respectivamente. O quadro 3 ilustra os resultados.

5.3.2. Produção de álcool etílico a partir de vários amidos, através do processo sem cozimento

O quadro 4 ilustra a conversão de amido a etanol através do processo sem cozimento, utilizando-se amiloglucosidase de Aspergillus niger. Foram obtidos 95,8%; 88,4%; 58,7% e 21,1% de conversão de amido de milho, mandioca, farinha de babaçú e amido de batata para etanol, respectivamente.

O quadro 5 ilustra os resultados da fermentação alcoólica através do processo sem cozimento, utilizando-se amiloglucosidase comercial (Diazyme). Foram obtidos: 93,0%; 80,1%; 64,6% e 11,4% de conversão de amido de milho, mandioca, farinha de babaçú e amido de batata para etanol, respectivamente.

Na fermentação alcoólica através do processo sem cozimento, utilizando-se amiloglucosidase de Aspergillus awamori NRRL 3112 foram obtidos 94,1%; 74,6%; 44,6% e 2,5% de conversão de amido de milho, mandioca, farinha de babaçú e amido de batata para etanol, respectivamente. O quadro 6 ilustra os resultados.

5.4. Estudo da relação entre o tempo e a fermentação alcoólica de vários amidos

O estudo da relação entre o tempo e a fermentação alcoólica de vários amidos foi realizado através dos processos com cozimento e sem cozimento. Os resultados de formação total de CO_2 foram comparados após o final da fermentação do amido a etanol.

5.4.1. Estudo da relação entre o tempo e a fermentação alcoólica de vários amidos, através do processo com cozimento

O estudo foi realizado de acordo com o item 4.8.1.

Na figura 1 estão representadas as relações entre o tempo (horas) e a produção de CO_2 (g) na fermentação alcoólica de vários amidos através do processo com cozimento, utilizando α -amilase bacteriana e amiloglucosidase de Aspergillus niger. Foram produzidos 10,3 g de CO_2 após 96 horas de fermentação de amido de milho e de batata; 8,6 g de CO_2 após 40 horas de fermentação de amido de mandioca e 7,2 g de CO_2 após 50 horas de fermentação de farinha de babaçú.

Na figura 2 estão representadas as relações entre o tempo (horas) e a produção de CO_2 (g) na fermentação alcoólica de vários amidos através do processo com cozimento utilizando α -amilase bacteriana e amiloglucosidase comercial (Diazyme). Foram produzidos 9,6 g de CO_2 após 96 horas de fermentação de amido de milho; 10,0 g de CO_2 após 89 horas de fermentação de amido de batata; 8,5 g de CO_2 após 87 horas de fermentação de amido de mandioca e 7,0 g de CO_2 após 50 horas de fermentação de farinha de babaçú.

Na figura 3 estão representadas as relações entre o tempo (horas) e a produção de CO_2 (g) na fermentação alcoólica de vários amidos com cozimento utilizando-se α -amilase bacteriana e amiloglucosidase de Aspergillus awamori NRRL 3112. Foram produzidos 10,1 g de CO_2 após 101 horas de fermentação de amido de batata; 9,7 g de

CO₂ após 48 horas de fermentação de amido de milho; 8,4 g de CO₂ após 26 horas de fermentação de amido de mandioca e 7,2 g de CO₂ após 50 horas de fermentação de farinha de babaçú.

5.4.2. Estudo da relação entre o tempo e a fermentação alcoólica de vários amidos, através do processo sem cozimento

O estudo foi realizado de acordo com o item 4.8.2.

Na figura 4 estão representadas as relações entre o tempo e a fermentação alcoólica de vários tipos de amido através do processo sem cozimento, utilizando amiloglucosidase de Aspergillus niger. Foram produzidos 10,1 g de CO₂ após 95 horas de fermentação de amido de milho; 7,8 g de CO₂ após 108 horas de fermentação de amido de mandioca; 5,9 g de CO₂ após 102 horas de fermentação de farinha de babaçú e 1,2 g de CO₂ após 132 horas de fermentação de amido de batata.

A figura 5 ilustra os resultados do estudo utilizando amiloglucosidase comercial (Diazyme). Foram obtidos: 8,8 g de CO₂ após 96 horas de fermentação de amido de milho; 8,1 g de CO₂ após 113 horas de fermentação de amido de mandioca; 6,2 g de CO₂ após 107 horas de fermentação de farinha de babaçú e 1,1 g de CO₂ após 137 horas de fermentação de amido de batata.

Na figura 6 estão apresentadas as relações entre o tempo e a fermentação alcoólica de diferentes amidos, através do processo sem cozimento, utilizando amiloglucosidase de Aspergillus awamo

ri NRRL 3112. Foram obtidos 9,0 g de CO_2 após 120 horas de fermentação de amido de milho; 7,9 g de CO_2 após 113 horas de fermentação de amido de mandioca; 3,9 g de CO_2 após 107 horas de fermentação de amido de babaçú e 0,7 g de CO_2 após 147 horas de fermentação de amido de batata.

5.5. Estudo da produção de etanol a partir de farinha de babaçú, empregando os processos com ou sem cozimento, sem ou com celulase de Trichoderma viride QM 9414 na mistura de fermentação

O estudo foi realizado empregando-se os processos com cozimento e sem cozimento, de acordo com os itens 4.9.1 e 4.9.2, respectivamente. Os resultados estão descritos a seguir, nos itens 5.5.1. e 5.5.2.

5.5.1. Estudo da produção de etanol a partir de farinha de babaçú, empregando o processo com cozimento e sem ou com celulase na mistura de fermentação

O quadro 7 ilustra os resultados obtidos após 3 dias de fermentação de farinha de babaçú empregando α -amilase bacteriana e amiloglucosidase de Aspergillus awamori NRRL 3112 no processo com cozimento; sem ou com celulase na mistura de fermentação.

Na fermentação de farinha de babaçú, na ausência de celulase, foram obtidos 7,0 g de CO_2 total; 6,2 g de etanol e uma conversão

de amido a etanol de 60,5%.

Na fermentação de farinha de babaçú empregando o processo com cozimento e celulase de Trichoderma viride QM 9414 foram obtidos 6,9 g de CO_2 ; 6,78 g de etanol e uma conversão de amido a etanol de 66,3%.

5.5.2. Estudo da produção de etanol a partir de farinha de babaçú, empregando processo sem cozimento e sem ou com celulase na mistura de fermentação

O quadro 8 ilustra os resultados obtidos após 7 dias de fermentação de farinha de babaçú empregando o processo sem cozimento, sem celulase e com celulase na mistura de fermentação.

Na fermentação de farinha de babaçú sem celulase na mistura, foram obtidos 4,2 g de CO_2 ; 5,0 g de etanol e uma conversão de amido a etanol de 48,9%.

No mesmo quadro 8, na fermentação alcoólica de farinha de babaçú com celulase de Trichoderma viride QM 9414 na mistura de fermentação foram obtidos 3,8 g de CO_2 ; 5,6 g de etanol e uma conversão de amido a etanol de 54,9%.

5.6. Estudo da produção de etanol a partir de farinha de babaçú, empregando celulase de Trichoderma viride QM 9414

O estudo foi realizado de acordo com o item 4.10. A figura 7 ilus

tra a fermentação de farinha de babaçú empregando celulase de Trichoderma viride QM 9414 na mistura de fermentação. O quadro 9 ilustra que foram obtidos 0,7 g de CO₂; 1,3 g de etanol e 9,3% de conversão de amido a etanol.

6. DISCUSSÃO

6.1. Produção de amiloglucosidase

A atividade de amiloglucosidase de farelo fúngico de Aspergillus awamori NRRL 3112 e Aspergillus niger determinada de acordo com o item 4.1, foi de 5,63 e 1,06 unidades de amiloglucosidase por grama, respectivamente, como mostram os resultados no item 5.1.

O Aspergillus awamori NRRL 3112 produziu amiloglucosidase de maior atividade do que a enzima de Aspergillus niger, porém a utilização desta última amiloglucosidase resultou em maior conversão de amido a etanol, embora a atividade fosse menor, o que significa que, para a produção de álcool, atuaram outras enzimas envolvidas além da amiloglucosidase.

6.2. Produção de α -amilase bacteriana

A atividade de α -amilase de Bacillus subtilis NRRL B-941 produzida no laboratório, de acordo com o item 4.4.2, foi de 2000 unidades/g de enzima. Foi empregada uma quantidade de 0,5 g de enzima (ou 1000 unidades) para a liquefação de 24,5 g de amido (20 g de açúcares redutores), observando-se que pode ser empregada para a liquefação de 24,5 g de amido (20 g de açúcares redutores), somente 0,25 g de enzima (ou 500 unidades).

6.3. Produção de álcool etílico a partir de vários amidos sem ou com cozimento

Os resultados de produção de álcool etílico a partir de vários amidos empregando o processo com cozimento estão descritos nos itens 5.3.1 e quadros 1, 2 e 3 e os resultados obtidos empregando-se o processo sem cozimento estão descritos nos itens 5.3.2. e quadros 4, 5 e 6. Observou-se rendimento de etanol semelhante, empregando-se o processo com cozimento e o processo sem cozimento na fermentação de amido de milho e de mandioca. As figuras 8, 9 e 10 ilustram esses resultados. A produção de etanol a partir de variedades de mandioca empregando o processo sem cozimento foi pesquisada anteriormente e os autores obtiveram resultados similares (36).

A diferença no rendimento de etanol, comparando-se o processo com cozimento e o processo sem cozimento foi significativa no caso de farinha de babaçú. No caso de amido de batata, a diferença de rendimento de etanol foi muito grande, como ilustrado nas figuras 8, 9 e 10. O rendimento de etanol empregando-se processo sem cozimento foi menor em amido de batata mostrando que o amido de batata é bem resistente ao ataque enzimático sendo, provavelmente, devido ao alto grau de cristalização que o amido de batata apresenta sem o cozimento.

Comparando-se a ordem de atividade enzimática da amiloglucosidase de Aspergillus awamori NRRL 3112 e de Aspergillus niger com o

grau de conversão de amido a etanol empregando-se o processo sem cozimento (quadros 5 e 6), observou-se que a amiloglucosidase de Aspergillus niger apresentou melhor desempenho na conversão de a mido a etanol com todos os amidos testados. O mesmo resultado foi observado na conversão de amido a etanol empregando-se o processo com cozimento. Provavelmente, existe outro fator envolvido na conversão de amido a etanol com amiloglucosidase.

Das três amiloglucosidasas estudadas, observou-se que tanto para o processo com cozimento ou sem cozimento a maior conversão dos a midos a etanol foi obtida utilizando-se, em primeiro lugar, amilo glucosidase de Aspergillus niger, em segundo, amiloglucosidase comercial (Diazyme) e, por último, Aspergillus awamori NRRL 3112.

6.4. Estudo da relação entre o tempo e a fermentação alcoólica de vários amidos com ou sem cozimento

Os resultados do estudo da relação entre o tempo e a fermentação alcoólica de vários amidos empregando-se o processo com cozimento e sem cozimento estão descritos nos itens 5.4.1 e 5.4.2, respecti vamente, e figuras 1, 2, 3 e 4, 5, 6.

Comparando-se os resultados da produção de CO_2 (g) em relação ao tempo (horas), em ambas as fermentações, com cozimento, descritos no item 5.4.1 e, sem cozimento, descritos no item 5.4.2, observou -se que as fermentações com cozimento são mais rápidas (figuras 1, 2 e 3) que as sem cozimento (figuras 4, 5 e 6).

Comparando-se a fermentação dos amidos sem cozimento, observou-se que a fermentação do amido de milho foi mais rápida em relação à do amido de mandioca, farinha de babaçú e amido de batata, indicando que a estrutura do amido de milho é mais sensível ao ataque pelas enzimas amilolíticas do que os outros amidos estudados.

6.5. Estudo da produção de etanol a partir de farinha de babaçú, através do processo com ou sem cozimento e sem ou com celulase de Trichoderma viride QM 9414 na mistura de fermentação

No estudo da produção de álcool etílico em farinha de babaçú com cozimento e sem cozimento, observou-se uma diferença significativa na conversão de amido a etanol quando se emprega celulase de Trichoderma viride QM 9414. Para o processo com cozimento, empregando celulase, a conversão de amido a etanol foi de 66,3% e, sem celulase, a conversão de amido a etanol foi de 60,5%, como mostrado no quadro 7.

No processo sem cozimento, com celulase de Trichoderma viride QM 9414, a conversão de amido a etanol foi de 54,9% e, sem celulase a conversão de amido a etanol foi de 48,9%, como descrito no quadro 8.

Nos processos com e sem cozimento pode-se observar um aumento na porcentagem de etanol de 5,9% com a adição de celulase de Trichoderma viride QM 9414 na mistura de fermentação. Este fenômeno é devido ao fato de que, em geral, Trichoderma viride não somente

produz celulase mas também outras enzimas que degradam materiais celulósicos tais como pentosanase, protopectinase, etc. (36). Assim, as enzimas complexas de Trichoderma viride QM 9414 - aparentemente liberam o amido e aumentam o contato com amiloglucosidase.

6.6. Estudo para a produção de etanol em farinha de babaçú, empregando celulase de Trichoderma viride QM 9414

Na fermentação de farinha de babaçú empregando apenas celulase de Trichoderma viride QM 9414 e levedura, sem enzimas amilolíticas, segundo os resultados do item 5.6, observou-se que a enzima proveniente de Trichoderma viride QM 9414 degrada materiais celulósicos a açúcares fermentáveis, obtendo-se 9,3% de etanol, como citado no quadro 9.

FIGURA 1 - Estudo da relação entre o tempo e a fermentação alcoólica de vários amidos, com cozimento, empregando α -amilase bacteriana e amiloglucosidase de Aspergillus niger.

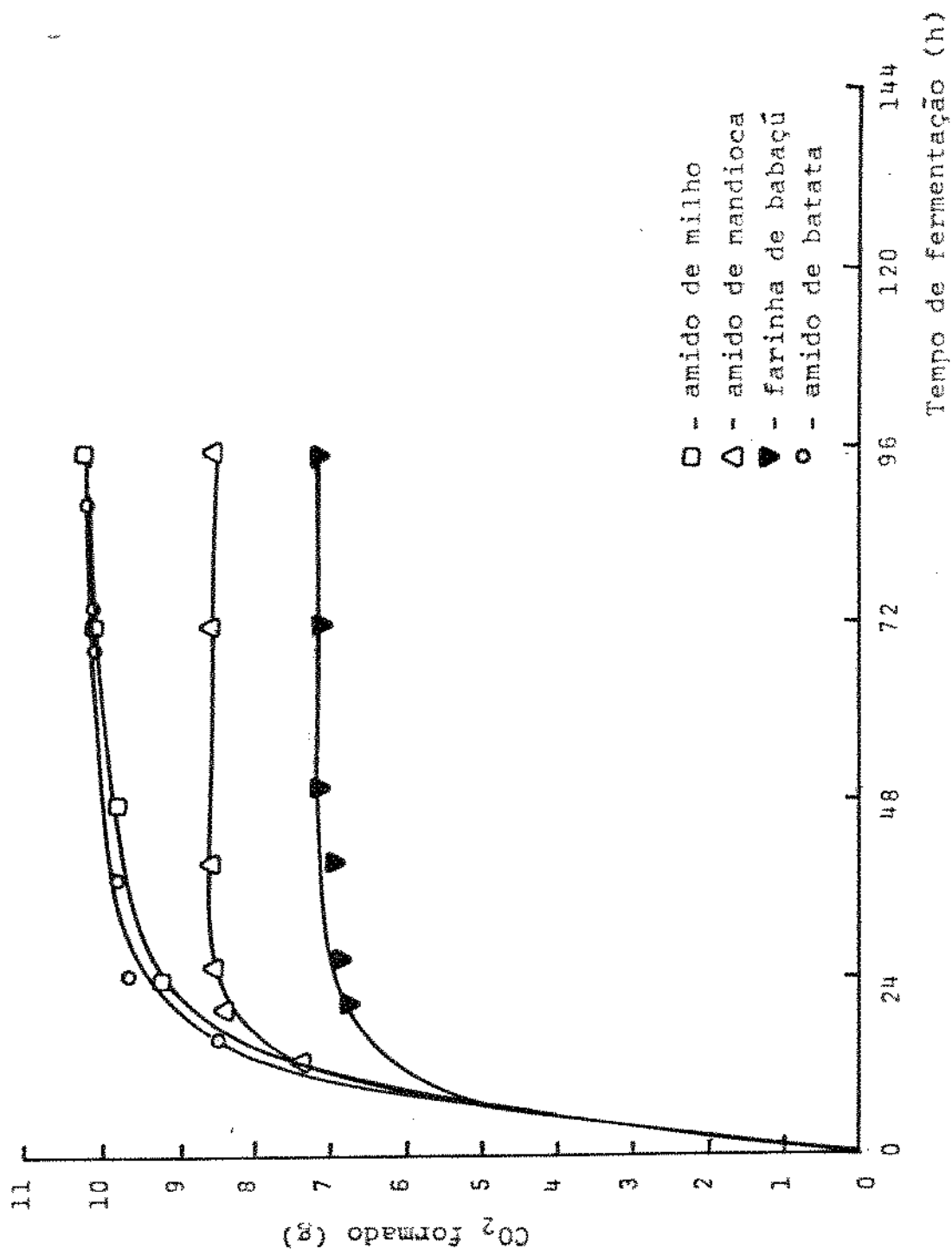


FIGURA 2 - Estudo da relação entre o tempo e a fermentação alcoólica de vários amidos, com cozimento empregando α -amilase bacteriana e amiloglucosidase comercial (Diazyme).

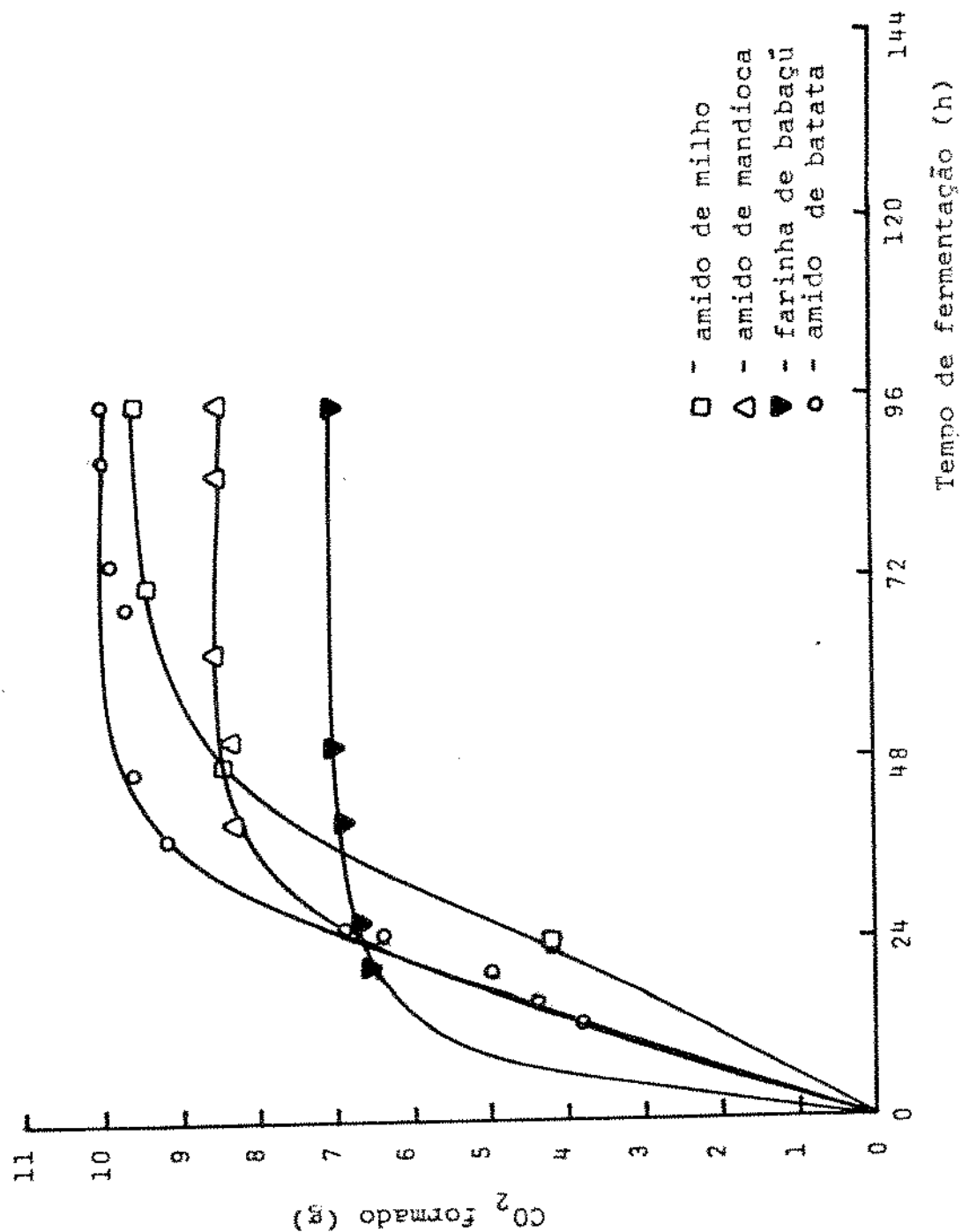
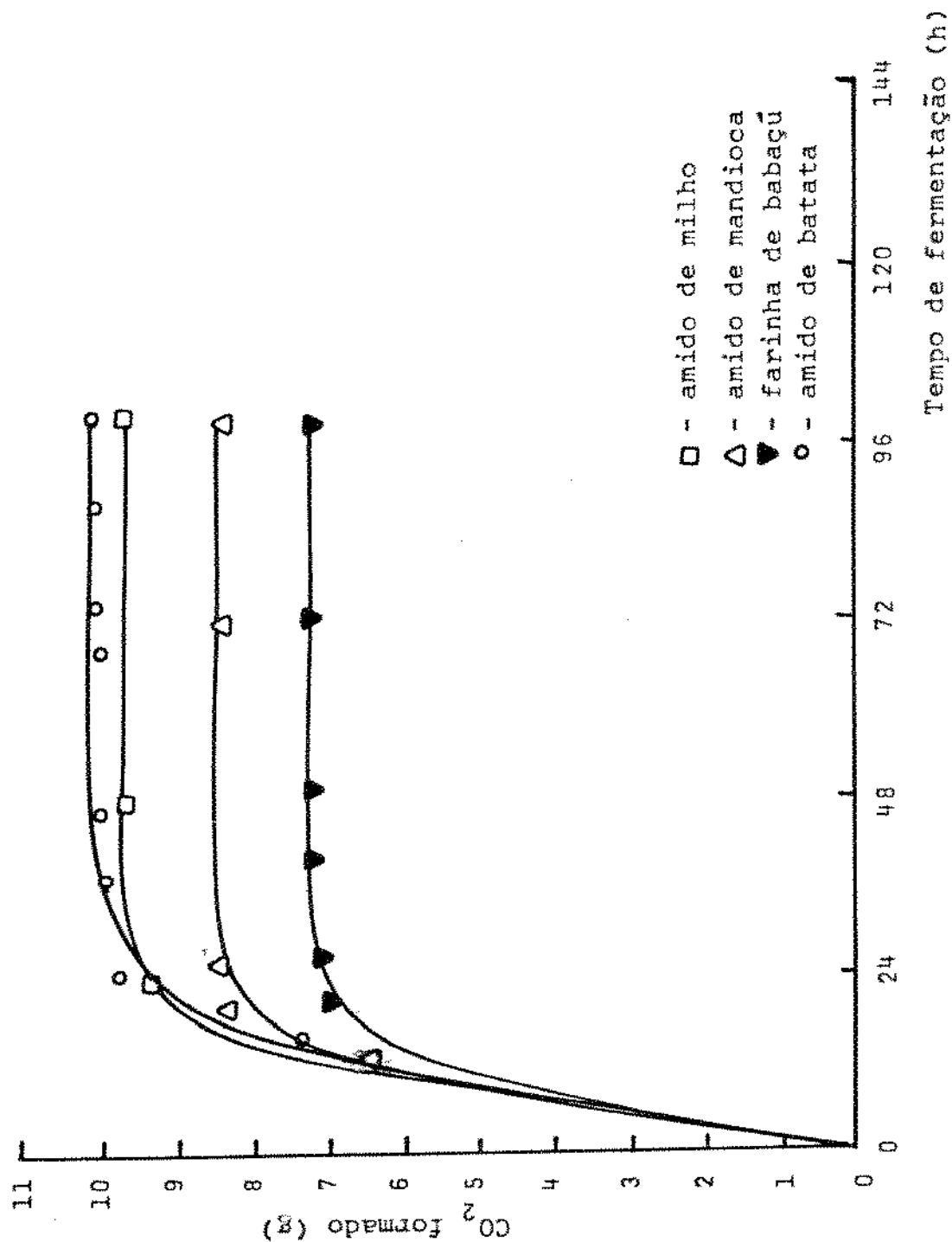


FIGURA 3 - Estudo da relação entre o tempo e a fermentação alcoólica de vários amidos, com cozimento, empregando α -amilase bacteriana e amiloglucosidase de Aspergillus awamori NRRL 3112.



, FIGURA 4 - Estudo da relação entre o tempo e a fermentação alcoólica de vários amidos, sem cozimento, empregando amiloglucosidase de Aspergillus niger.

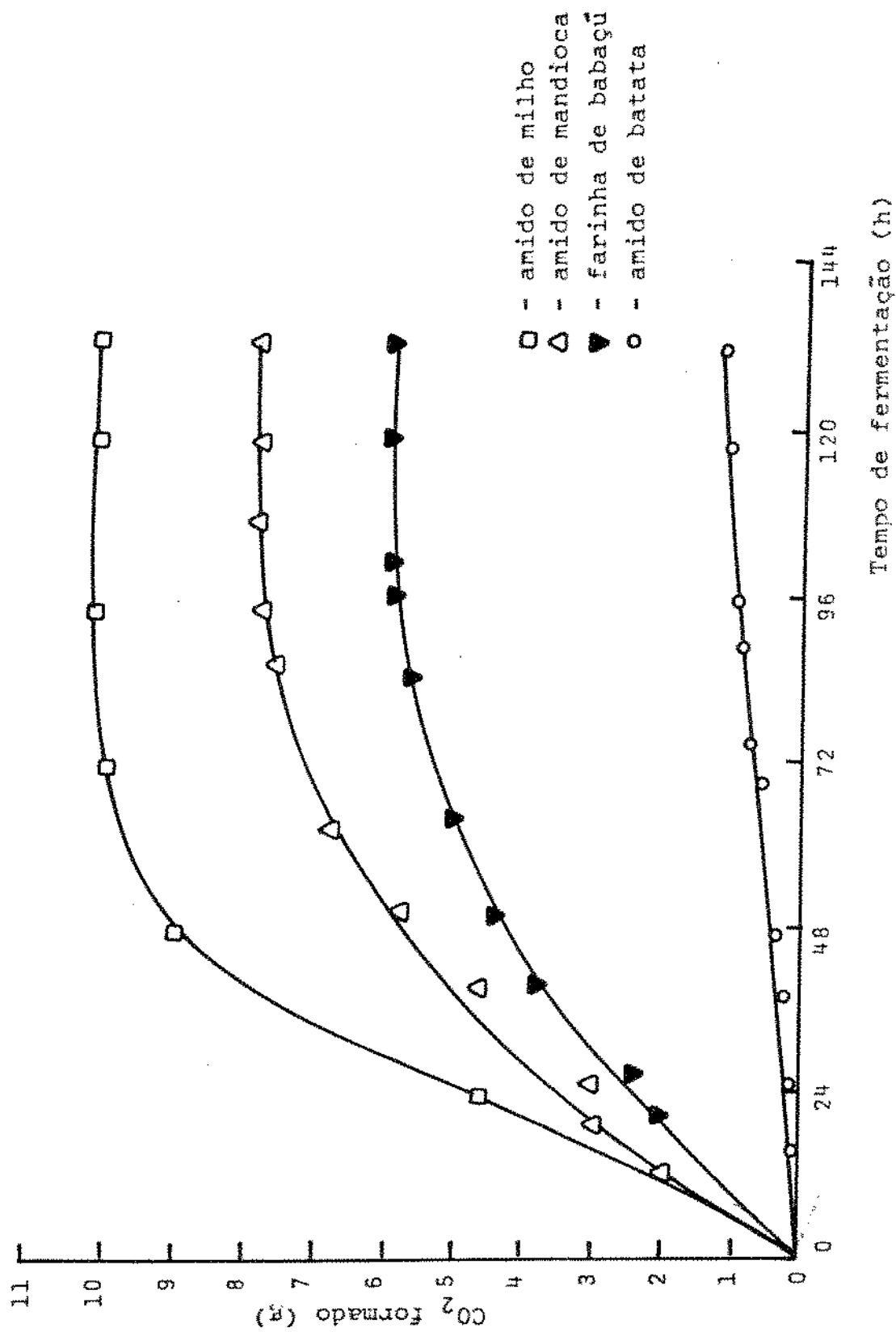


FIGURA 5 - Estudo da relação entre o tempo e a fermentação alcoólica de vários amidos, sem cozimento, empregando amiloglucosidase comercial (Diazyme).

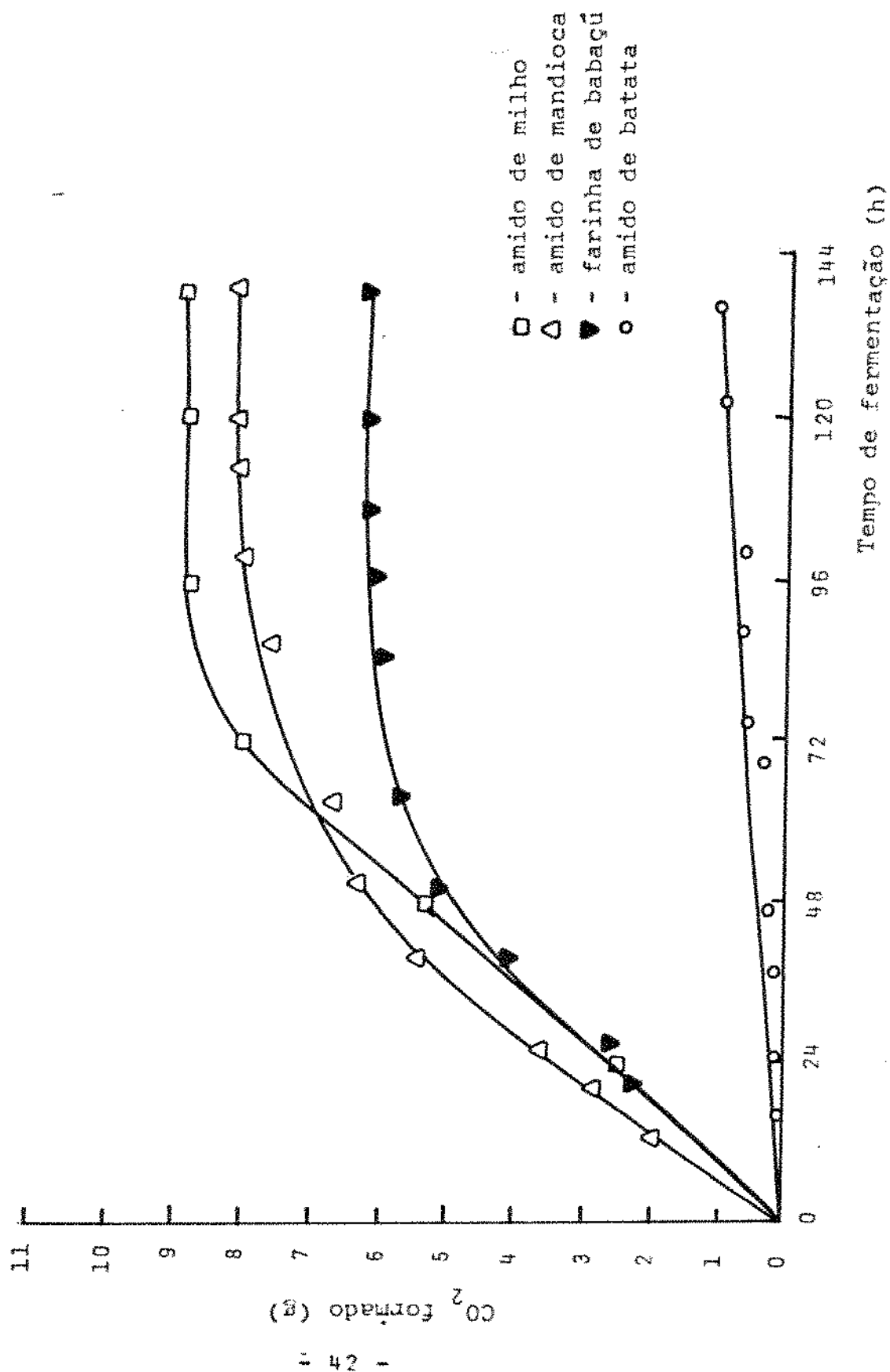


FIGURA 6 - Estudo da relação entre o tempo e a fermentação alcoólica de vários amidos, sem cozimento, empregando amiloglucosidase de Aspergillus a wamori NRRL 3112.

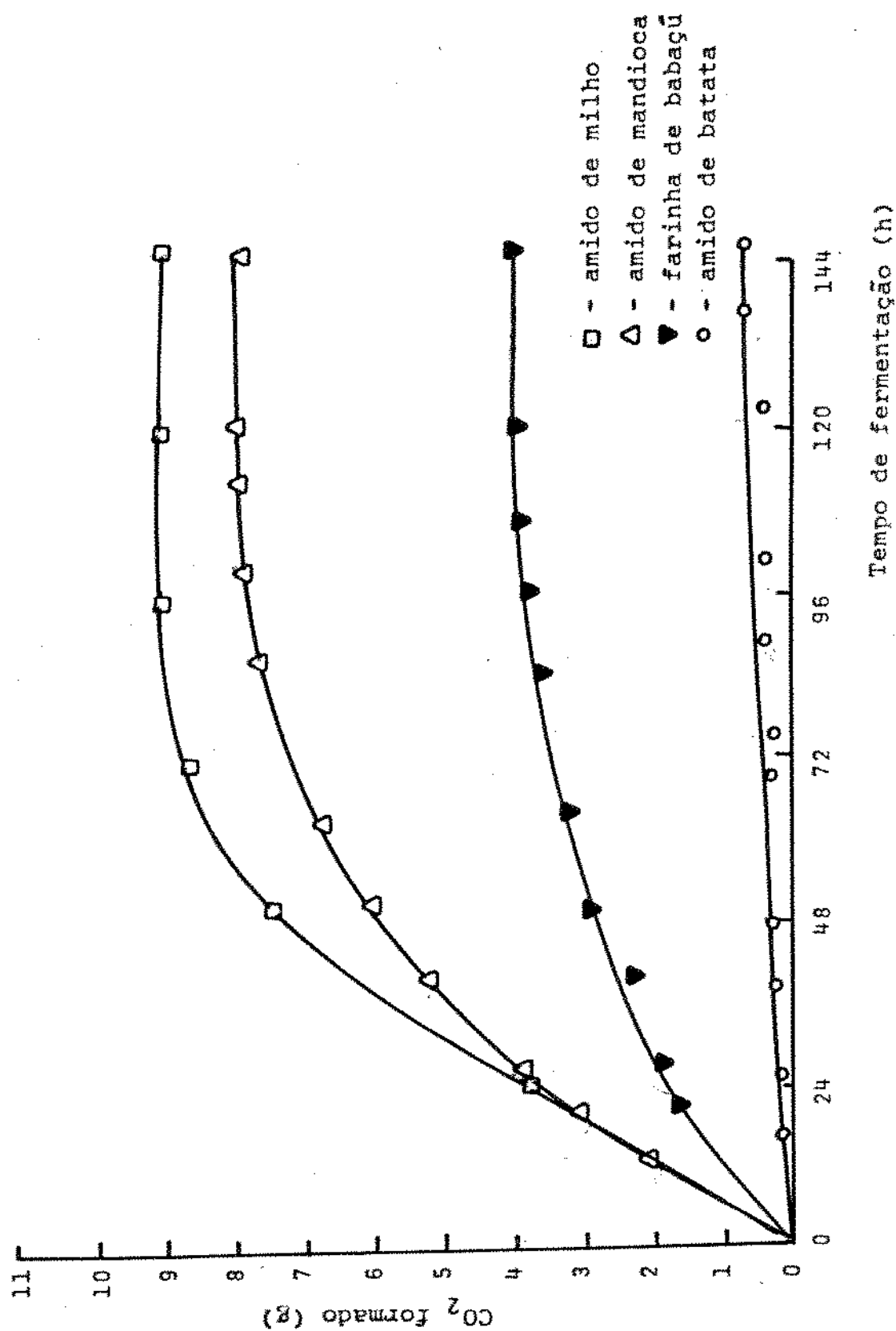


FIGURA 7 - Estudo para a produção de etanol a partir de Farinha de babaçû, empregando celulase de Trichoderma viride QM 9414.

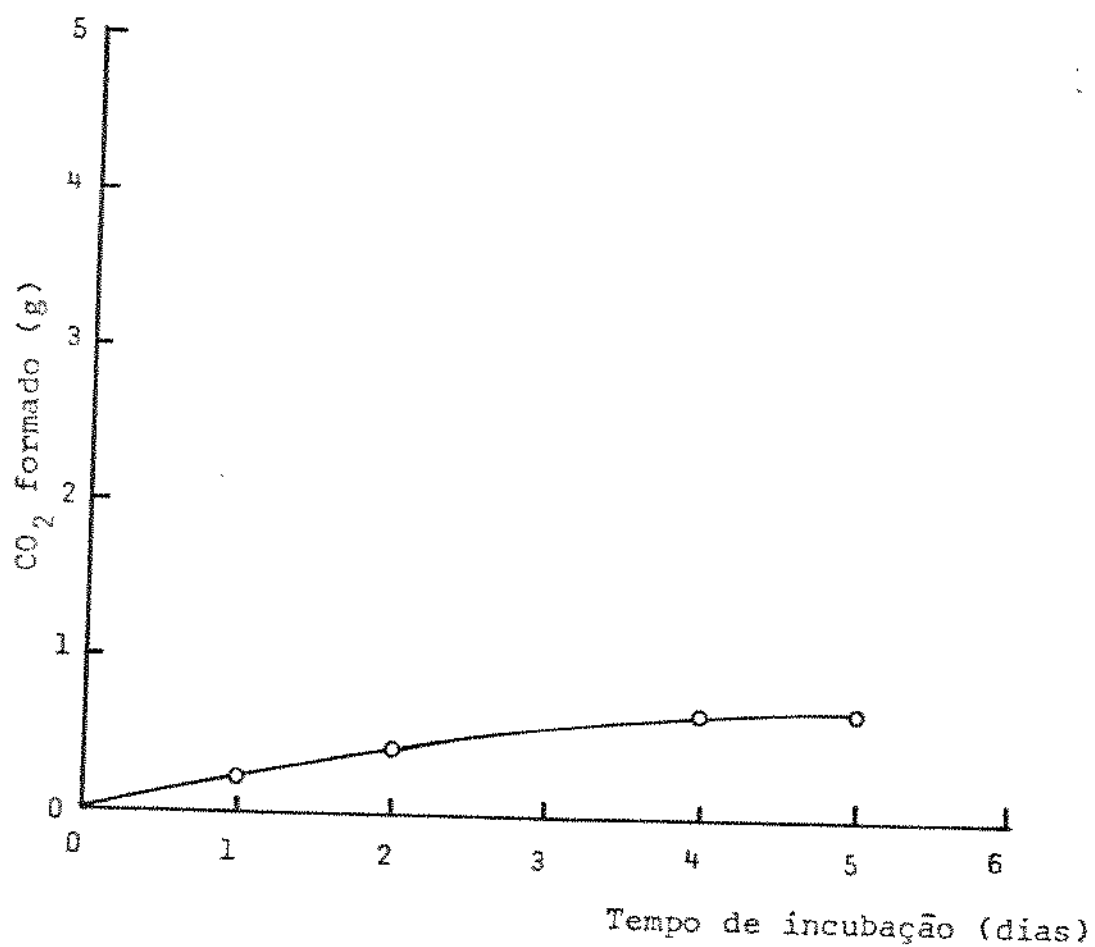


FIGURA 8 - Comparação da % de produção de etanol a partir de vários amidos, utilizando-se amiloglucosidase de Aspergillus niger nos processos de fermentações com cozimento, e sem cozimento.

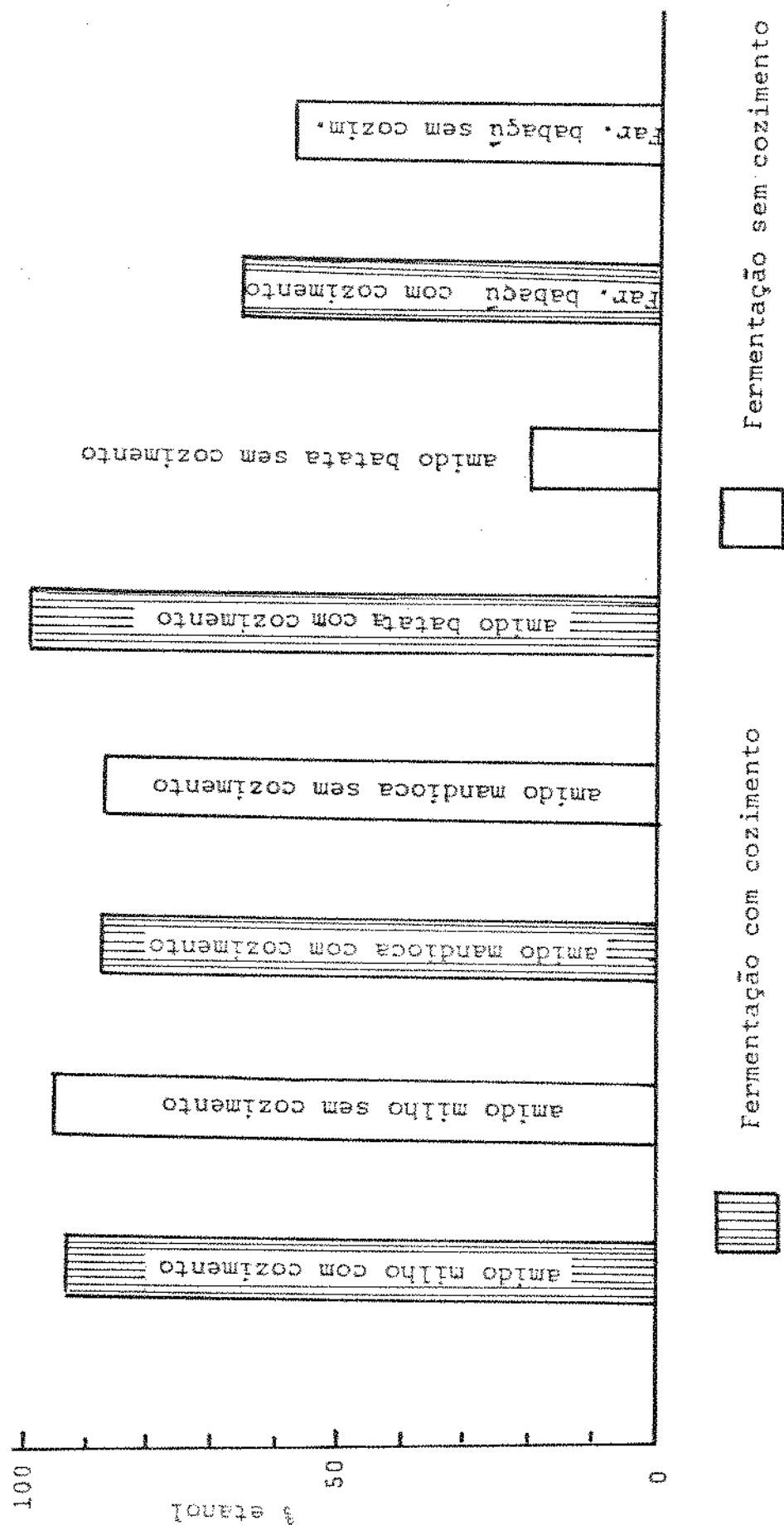


FIGURA 9 - Comparação da % da produção de etanol a partir de vários amidos, utilizando-se amiloglucosidase de Aspergillus awamori NRRL 3112 nos processos de fermentações com cozimento, e sem cozimento.

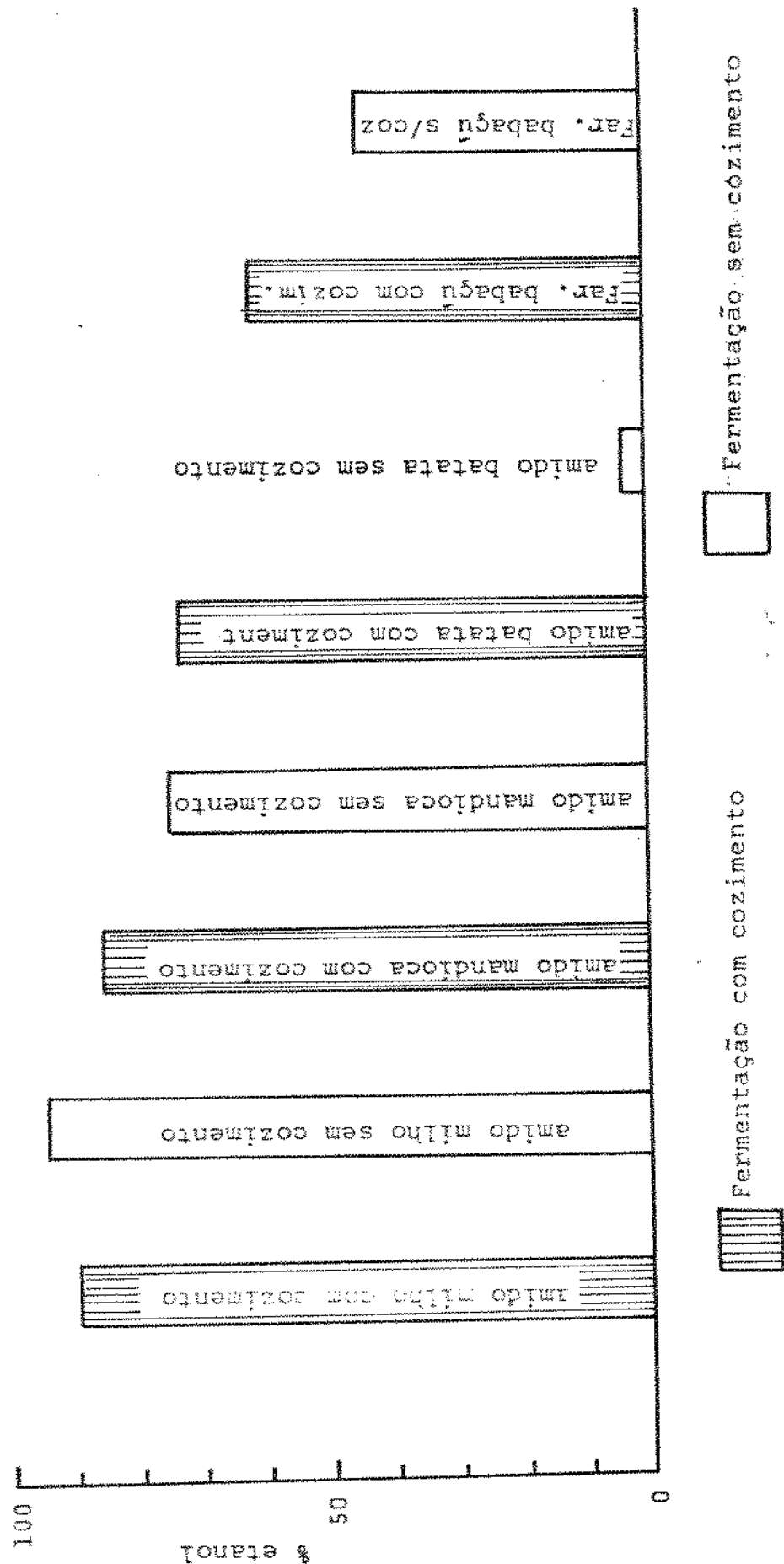


FIGURA 10 - Comparação da % de produção de etanol a partir de vários amidos, utilizando-se amiloglucosidase comercial nos processos de fermentações com cozimento, e sem cozimento

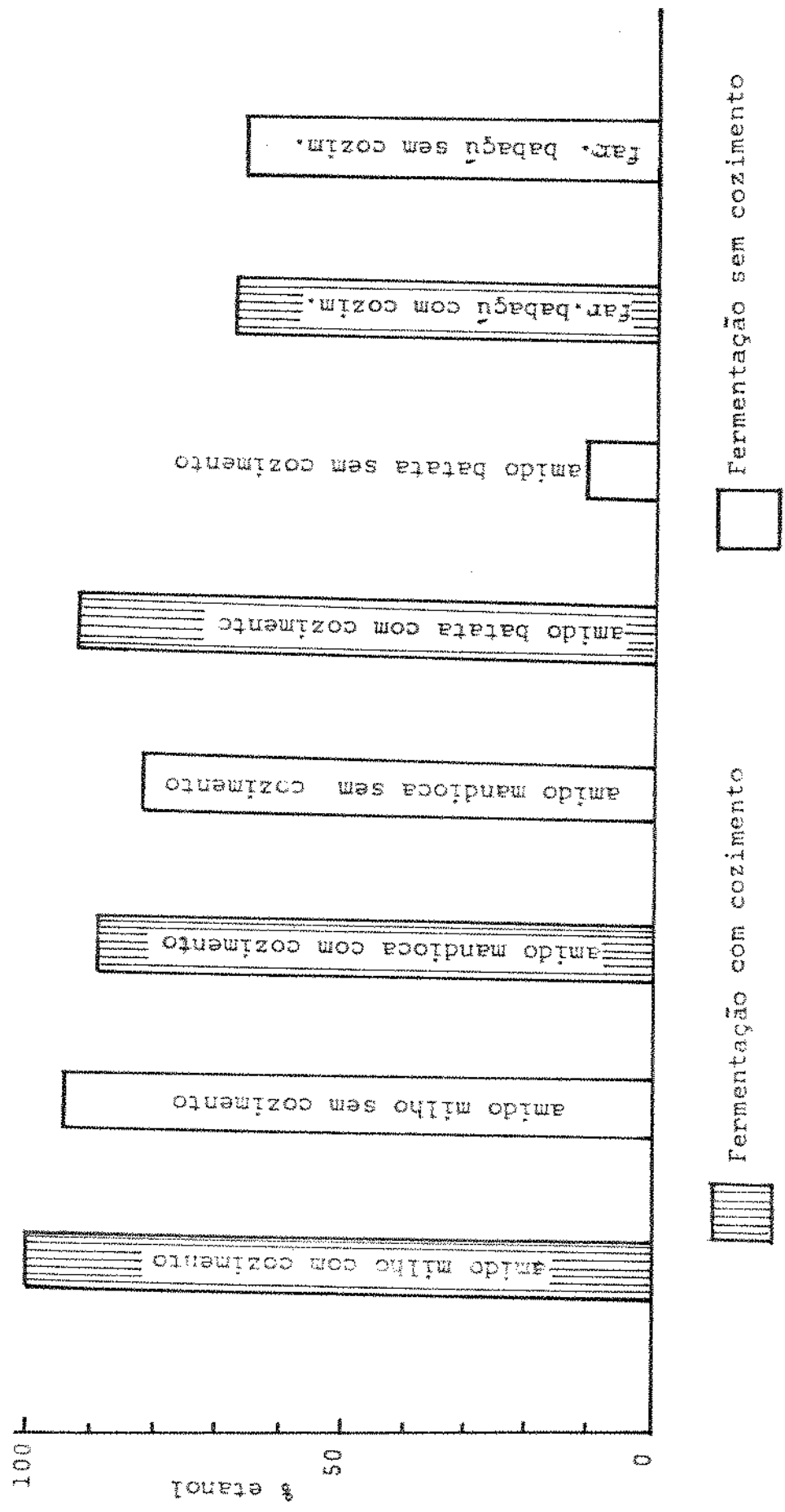
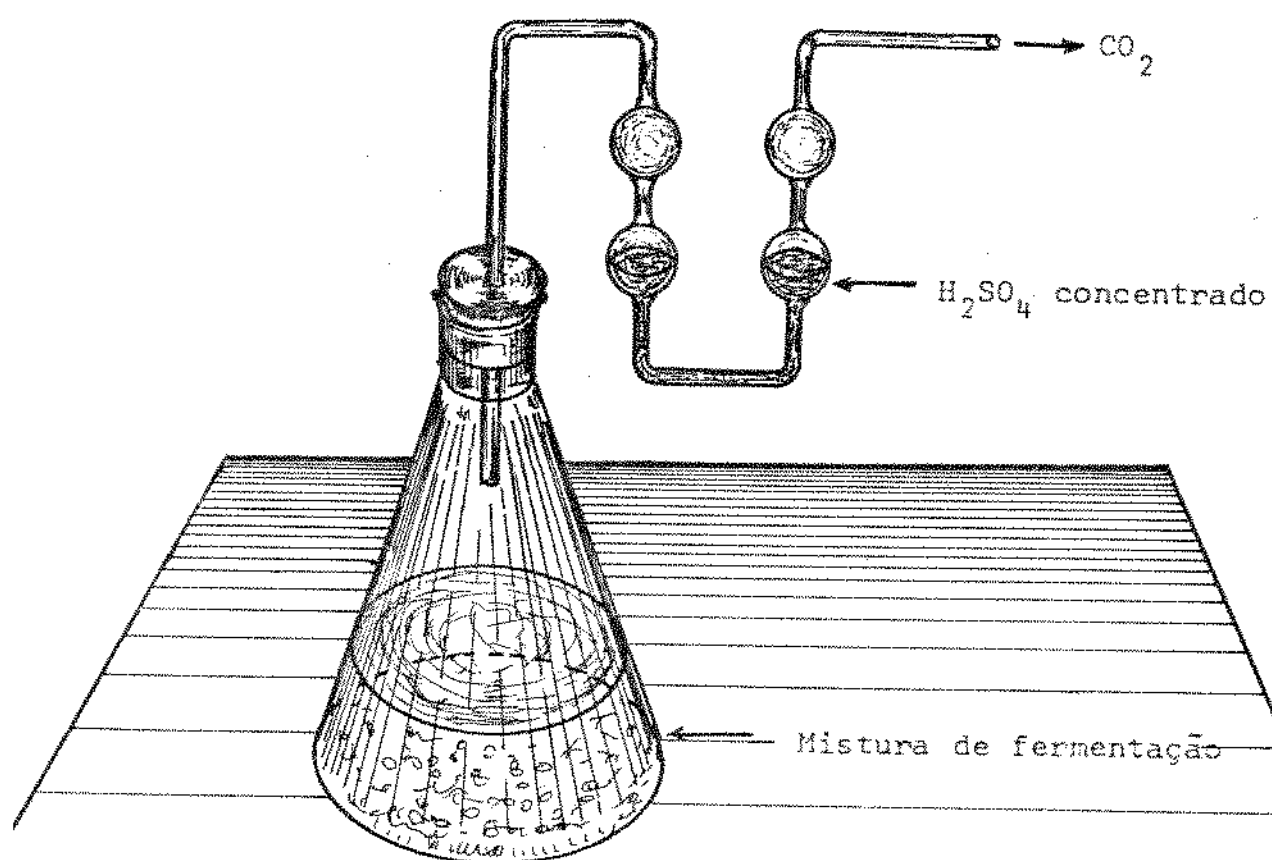


FIGURA 11 - Sistema usado na fermentação alcoólica.



QUADRO 1 - Produção de álcool etílico a partir de vários amidos com cozimento, empregan-
do α -amilase bacteriana e amiloglucosidase de Aspergillus niger.

AMIDOS	AÇÚCARES REDUTORES (g)		FORMAÇÃO DE CO ₂ (g)	ETANOL FORMADO (g)	ETANOL TEÓRICO (g)	CONVERSÃO DE AMIDO A ETANOL (%)
	ANTES FERMENTAÇÃO	APÓS FERMENTAÇÃO				
Amido de milho	20	1,36	10,3	0,61	10,22	94,0
Amido de mandioca	20	1,9	8,6	9,03	10,22	88,4
Amido de batata	20	1,09	10,3	10,14	10,22	99,2
Farinha de babaçu	20	4,22	7,2	6,76	10,22	66,1

QUADRO 2 - Produção de álcool etílico a partir de vários amidos com cozimento, empregando α -amilase bacteriana e amiloglucosidase comercial (Diazyme)

AMIDOS	AÇÚCARES REDUTORES (g)		FORMAÇÃO DE CO ₂ (g)	ETANOL FORMADO (g)	ETANOL TEÓRICO (g)	CONVERSÃO DE AMIDO A ETANOL (%)
	ANTES FERMENTAÇÃO	APÓS FERMENTAÇÃO				
Amido de milho	20	0,55	9,6	10,0	10,22	97,9
Amido de mandioca	20	0,29	8,5	8,98	10,22	87,9
Amido de batata	20	0,56	10,0	9,3	10,22	90,6
Farinha de babaçu	20	2,66	7,0	6,8	10,22	66,6

QUADRO 3 - Produção de álcool etílico a partir de vários amidos com cozimento, empregan-
do α -amilase bacteriana e amiloglucosidase de Aspergillus awamori NRRL 3112.

AMIDOS	AÇÚCARES REDUTORES (g)		FORMAÇÃO DE CO ₂ (g)	ETANOL FORMADO (g)	ETANOL TEÓRICO (g)	CONVERSÃO DE AMIDO A ETANOL (%)
	ANTES FERMENTAÇÃO	APÓS FERMENTAÇÃO				
Amido de milho	20	2,31	9,7	9,13	10,22	89,3
Amido de mandioca	20	2,52	8,4	8,71	10,22	85,2
Amido de batata	20	1,26	10,1	7,47	10,22	73,1
Farinha de babaçú	20	4,1	7,2	6,3	10,22	61,2

QUADRO 4 - Produção de álcool etílico a partir de vários amidos através do processo sem cozimento, empregando amiloglucosidade de Aspergillus niger.

AMIDOS	AÇÚCARES REDUTORES (g)		FORMAÇÃO DE CO ₂ (g)	ETANOL FORMADO (g)	ETANOL TEÓRICO (g)	CONVERSÃO DE AMIDO A ETANOL (%)
	ANTES FERMENTAÇÃO	APÓS FERMENTAÇÃO				
Amido de milho	20	1,53	10,1	9,79	10,22	95,8
Amido de mandioca	20	1,4	7,8	9,03	10,22	88,4
Amido de batata	20	11,5	1,2	2,16	10,22	21,1
Farinha de babaçu	20	2,95	5,9	6,0	10,22	58,7

QUADRO 5 - Produção de álcool etílico a partir de vários amidos através do processo sem cozimento, empregando amiloglucosidase comercial (Diazyme)

AMIDOS	AÇÚCARES REDUTORES (g)		FORMAÇÃO DE CO ₂ (g)	ETANOL FORMADO (g)	ETANOL TEÓRICO (g)	CONVERSÃO DE AMIDO A ETANOL (%)
	ANTES FERMENTAÇÃO	APÓS FERMENTAÇÃO				
Amido de milho	20	0,65	8,8	9,5	10,22	93,0
Amido de mandioca	20	0,003	8,1	8,2	10,22	80,1
Amido de batata	20	11,55	1,1	1,2	10,22	11,4
Farinha de babaçu	20	4,59	6,2	6,6	10,22	64,6

QUADRO 6 - Produção de álcool etílico a partir de vários amidos, através do processo sem cozimento, empregando amiloglucosidase de Aspergillus awamori NRRL 3112.

AMIDOS	AÇÚCARES REDUTORES (g)		FORMAÇÃO DE CO ₂ (g)	ETANOL FORMADO (g)	ETANOL TEÓRICO (g)	CONVERSÃO DE AMIDO A ETANOL (%)
	ANTES FERMENTAÇÃO	APÓS FERMENTAÇÃO				
Amido de milho	20	1,78	9,0	9,62	10,22	94,1
Amido de mandioca	20	1,38	7,9	7,62	10,22	74,6
Amido de batata	20	15,1	0,7	0,26	10,22	2,5
Farinha de babaçu	20	6,85	3,9	4,6	10,22	44,6

QUADRO 7 - Produção de álcool etílico a partir de farinha de babaçú através do processo com cozimento, sem ou com celulase e empregando α -amilase bacteriana e amilo glucosidase de Aspergillus awamori NRRL 3112.

Sem celulase

AMIDO	AÇÚCARES REDUTORES (g)		FORMAÇÃO DE CO ₂ (g)	ETANOL FORMADO (g)	ETANOL TEÓRICO (g)	CONVERSÃO DE AMIDO A ETANOL (%)
	ANTES FERMENTAÇÃO	APÓS FERMENTAÇÃO				
Farinha de babaçú	20	3,0	7,0	6,2	10,22	60,5

10 g de *Trichoderma viride* QM 9414

AMIDO	AÇÚCARES REDUTORES (g)		FORMAÇÃO DE CO ₂ (g)	ETANOL FORMADO (g)	ETANOL TEÓRICO (g)	CONVERSÃO DE AMIDO A ETANOL (%)
	ANTES FERMENTAÇÃO	APÓS FERMENTAÇÃO				
Farinha de babaçú	20	4,2	6,9	6,78	10,22	63,3

QUADRO 8 - Produção de álcool etílico a partir de farinha de babaçú, através do processo sem cozimento, sem ou com celulase e empregando α -amilase bacteriana e amiloglucosidase de Aspergillus awamori NRRL 3112.

Sem celulase

AMIDO	AÇÚCARES REDUTORES (g)		FORMAÇÃO DE CO ₂ (g)	ETANOL FORMADO (g)	ETANOL TEÓRICO (g)	CONVERSÃO DE AMIDO A ETANOL (%)
	ANTES FERMENTAÇÃO	APÓS FERMENTAÇÃO				
Farinha de babaçú	20	7,7	4,2	5,0	10,22	48,9

10 g de Trichoderma viride QM 9414

AMIDO	AÇÚCARES REDUTORES (g)		FORMAÇÃO DE CO ₂ (g)	ETANOL FORMADO (g)	ETANOL TEÓRICO (g)	CONVERSÃO DE AMIDO A ETANOL (%)
	ANTES FERMENTAÇÃO	APÓS FERMENTAÇÃO				
Farinha de babaçú	20	8,1	3,8	5,6	10,22	54,9

QUADRO 9 - Estudo da produção de álcool em farinha de babaçú, empregando celulase de Trichoderma viride QM 9414.

AMIDO	AÇÚCARES REDUTORES (g)		FORMAÇÃO DE CO ₂ (g)	ETANOL FORMADO (g)	ETANOL TEÓRICO (g)	CONVERSÃO DE AMIDO A ETANOL (%)
	ANTES FERMENTAÇÃO	APÓS FERMENTAÇÃO				
Farinha de babaçú	20	18,2	0,7	1,3	10,22	9,3

7. CONCLUSÃO

7.1. A amiloglucosidase foi produzida por fermentação semi-sólida usando as linhagens de Aspergillus awamori NRRL 3112 e Aspergillus niger.

O Aspergillus awamori NRRL 3112 produziu amiloglucosidase de maior atividade do que a enzima de Aspergillus niger, porém a utilização de amiloglucosidase de Aspergillus niger resultou em maior conversão de amido a etanol, o que significa que outras enzimas estão provavelmente envolvidas na conversão de amido a etanol.

7.2. Nas fermentações para a produção de álcool etílico a partir de vários amidos obteve-se pouca diferença no rendimento de etanol a partir de amido de milho e de mandioca e observou-se que o tempo de conversão foi menor no processo com cozimento e maior no processo sem cozimento. No caso de farinha de babaçú a diferença na produção de etanol foi significativa entre os dois processos, com cozimento e sem cozimento e, no caso de amido de batata, obteve-se diferença muito grande no rendimento de etanol, entre os processos com cozimento e sem cozimento. Como no processo com cozimento emprega-se aquecimento para a liquefação do amido pela ação da α -amilase, uma das vantagens das fermentações utilizando-se o processo sem cozimento é o não emprego de energia.

Observou-se que a melhor amiloglucosidase para a conversão de a mido a etanol está na seguinte ordem decrescente: amiloglucosidase de Aspergillus niger, amiloglucosidase comercial (Diazyme) e por último amiloglucosidase de Aspergillus awamori NRRL 3112, as quais apresentavam, respectivamente, 1,06; 24,8 e 5,63 unidades de amiloglucosidase por grama.

Nos estudos das fermentações utilizando o processo sem cozimento e amiloglucosidasas provenientes de fontes diferentes, obteve-se, como melhor amido para a produção de etanol, a seguinte ordem de crescente: amido de milho, amido de mandioca e farinha de babaçú.

Nestes casos as fermentações utilizando processo com cozimento são mais rápidas do que as fermentações sem cozimento obtendo-se, ao final das fermentações, pouca diferença no rendimento de etanol. Observou-se também que o amido de batata sem cozimento, não apresentou bons resultados para a produção de etanol.

7.3. Em fermentações utilizando-se ambos os processos, com cozimento e sem cozimento e empregando celulase de Trichoderma viri de QM 9414 obteve-se um acréscimo no rendimento de etanol de 5,9%, sendo este acréscimo devido as enzimas celulolíticas de Trichoderma viride QM 9414 facilitarem o contato com o amido ou degradarem os materiais celulósicos.

7.4. Para aumentar o rendimento de etanol a partir de farinha de babaçú utilizou-se a celulase de Trichoderma viride QM 9414 e ob

servou-se que a mesma degrada a celulose da farinha de babaçú em açúcares fermentáveis, produzindo 9,3% de etanol sem a utilização de enzimas amilolíticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BALLS, A.K.; SCHWIMMER, S. Digestion of raw Starch. J. Biol. Chem. 156. 203-210. 1944.
2. BADENHUIZEN, N.P. Chemistry and Biology of the Starch granule. Protoplasmatologia. Edited by L.V. Heilbrunn and F. Weber. Band II, B, 2, b. Springer-verlag: Vienna, Austria. 1959.
3. BANZON, J.; FULMER, E.I.; UNDERKOFLE, L.A. Iowa State Coll. Fermentative utilization of cassava the production of Ethanol. J. Sci., 23. 219-235. 1949.
4. BANKS, W.; GREENWOOD, C.T. The incomplete β -Amylolysis of Amylose. Die Stärke Nr. 7/19. Jahrg. 197-206. 1967.
5. CORMAN, J.; LANGLYKKE, A.F. Action of Mold Enzymes in Starch-Saccharification. Cereal Chem., 25. 190-201, 1948.
6. CADMUS, M.C.; JAYKO, L.G.; SMILEY, K.L. Enzymatic Production of Glucose Syrup from Grains and its use in Fermentations. Cereal Chem. 43. 658-669. 1966.

7. DENAULT, L.J.; UNDERKOFER, L.A. Conversion of Starch by Mi
crobial Enzymes for Production of Syrups and Sugars. Cereal
Chem. 40. 618-629. 1963.
8. FLEMING, I.D. in: Starch and its Derivatives. Ed. J.A. Rad
ley (Chapman and Hall, London, 1968) p. 498-508.
9. GATES, R.L.; SANDSTEDT, R.M. A method of determining enzyma
tic digestion of raw Starch. Cereal Chem. 30. 413 - 419,
1953.
10. HOULE, M.J.; GOERING, K.J. Enzymatic Conversion of Barley.
Carbohydrate into Syrup. Food Technology. 15. 25-28. 1961.
11. KERR, R.W.; CLEVELAND, F.C.; KATZBECK, W.J. The Action of A
mylo-glucosidase on Amylose and Amylopectin. J. Am. Chem.
Soc. 73. 3916-3921. 1951.
12. KERR, R.W.; MEISEL H.; SCHINK, N. Corn Sirups of High Fermen
tability. Ind. & Eng. Chem. 34. 1232-1234. 1942.
13. LEACH, H.W.; SCHOCH, T.J. Structure of the Starch Granule.
Cereal Chem., 38. 34-46. 1961.

14. LEE, E.Y.C.; WHELAN, W.J. Enzymic Methods for the Microdetermi-
nation of Glycogen and Amylopectin, and their Unit - chain
Lengths. Arch. Biochem. Biophys. 116. 162-167 (1966).
15. MILES, LABORATORIES INC.; Chemicals Division, Elkhart, Indiana,
Diazyme Assay Procedure, including Schoorl reducing sugar
determination, Technical Bulletin, Assay nº 5-125, revised
8 - 4 - 66.
16. MARSHALL, J.J.; WHELAN, W.J. Incomplete conversion of Glycogen
and Starch by Crystalline Amyloglucosidase and its importan-
ce in the determination of amylaceous Polymers. FEBS Letters,
North-Holland Publishing Company-Amsterdam. 9. Nº 2. 85 - 88.
1970.
17. PARK, Y.K.; DE SANTI, M.S.S. Induction of high Amyloglucosida-
se-Producing Mutant from Aspergillus awamori. J. Ferment.
Technol., 55. Nº 2, 193-195. 1977.
18. PARK, Y.K.; PAPINI, R.S. Produção de Xarope de Glicose do Ami-
do de Mandioca pelo Método Enzima-Enzima. Revista Brasilei-
ra de Tecnologia. 1 13-16. 1970.

19. PARK, Y.K.; MARANCENBAUM, E.; MORGA, A.A. New Starch Resource: Study of Some Characteristics of the Starch by Enzyme Methods. J. Agric. Food Chem., 26. Nº 5. 1198-1200. 1978.
20. POOL, E.L.; UNDERKOFER, L.A. Amylolytic Factors of Bran Culture and Submerged Culture. Agricultural and Food Chemistry . 1. Nº 1. 87-90. 1953.
21. PARK, Y.K.; DE LIMA, D.C. Produção de Amiloglucosidase fúngica por Fermentação submersa e sua purificação. Revista Brasileira de Tecnologia. 3. 67-74. 1972.
22. PHILLIPS, L.L.; CALDWELL, M.L. A Study of the Action of Gluc Amylase, A Glucose-producing amylase, Formed by the Mold, Rhizopus delemar. J. Am. Chem. Soc. 73. 3563-3568. 1951.
23. PHILLIPS, L.L.; CALDWELL, M.L. A Study of the purification and Properties of a Glucose-forming Amylase from Rhizopus delemar, Gluc amylase. J. Am. Chem. Soc. 73. 3559-3563. 1951.
24. PAZUR, J.H.; ANDO, T. The hydrolysis of Glucosyl Oligosaccharides with α -D-(1-4) and α -D-(1-6) Bonds by fungal Amyloglucosidase. J. Biol. Chem. 235. 297-302. 1960.

25. PAZUR, J.H.; ANDO, T. The Action of an Amyloglucosidase of Aspergillus niger on Starch and Malto-Oligosaccharides. J. Biol. Chem. 234. 1966-1970. 1959.
26. PAZUR, J.H.; KLEPPE, K. The Hydrolysis of α -D-Glucosides by Amyloglucosidase from Aspergillus niger. J. Biol. Chem. 237 1002-1006. 1962.
27. PEAT, S.; TURVEY, J.R.; EVANS, J.M. The Structure of Floridean Starch. Part I. Linkage Analysis by Partial Acid Hydrolysis. J. Chem. Soc. 3223-3227. 1959.
28. PARK, Y.K.; ZENIN, C.T.; UEDA, S.; MARTINS, C.O.; NETO, M.P.S. Microflora in Beij   and their Biochemical Characteristics. J. Ferment. Technol. 60. N   1. 1-4. 1982.
29. REESE, E.T.; SIU, R.G.H.; LEVINSON, H.S. The biological degradation of soluble cellulose derivatives and its relationship to the mechanism of cellulose hydrolysis. J. Bacteriol. 59 485-497. 1950.
30. SMILEY, K.L.; CADMUS, M.C.; HENSLEY, D.E.; LAGODA, A.A. High Potency Amyloglucosidase-Producing Mold of the Aspergillus niger Group. Appl. Microbiology. 12. 455. 1964.

31. SALETAN, L.T. Carbohydrases of Interest in Brewing, with Particular Reference to Amyloglucosidase. Wallerstein Laboratories Communications. 31. 33-44. 1968.
32. SANDSTEDT, R.M.; KNEEN, E.; BLISH, M.J. A Standardized Wohlgemuth Procedure for alpha-amylase activity. Cereal Chem. 16. 712-723. 1939.
33. SOMOGYI, M.A. A new reagent for the determination of sugars. J. Biol. Chem. 160. 61-68. 1945.
34. TEIXEIRA, C.; ANDREASEN, A.A.; KOLACHOV, P. Ethyl Alcohol from Cassava. Industrial and Engineering Chemistry. 42. No 9. 1781-1783. 1950.
35. UNDERKOFER, L.A.; SEVERSON, G.M.; GOERING, K.J.; CHRISTENSEN, L.M. Commercial Production and Use of Mold Bran. Cereal Chem. 24. 1-22. 1947.
36. UEDA, S.; ZENIN, C.T.; MONTEIRO, D.A.; PARK, Y.K. Production of Ethanol from Raw Cassava Starch by a Nonconventional Fermentation Method. Biotechnology and Bioengineering XXIII. 291-299. 1981.