

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

"HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE AMIDO: INFLUÊNCIA DA
ALIMENTAÇÃO DA FARINHA DE GRÃOS DE SORGO SACARINO"

Tese de Mestrado:

LEDA MARIA DE SOUZA GOMES

Orientador:

PROF.^a DR.^a IRACEMA DE OLIVEIRA MORAES

14/86

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

- 1986 -

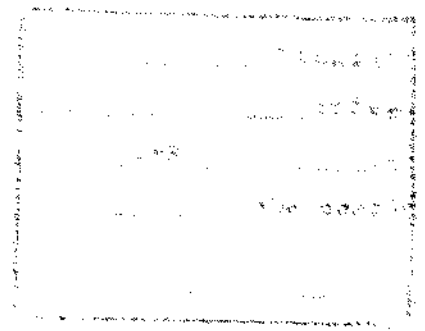
Parecer

Este exemplar corresponde a redação final
da tese defendida por Leda Maria de Souza
Gomes e aprovada pela Comissão Julgadora
em 16.12.86.

Campinas, 16 de dezembro de 1986.

Souza

Presidente da Banca



Ao FELIPE, meu esposo e amigo e aos
meus filhos, LIGIA e FREDERICO.

AGRADECIMENTOS

A Prof.^a Dr.^a Iracema de Oliveira Moraes, pela orientação deste trabalho.

Ao Departamento de Tecnologia de Alimentos da UNICAMP, pelas facilidades concedidas para que se utilizasse o laboratório de Tecnologia de Amido.

Aos professores Carlos Osamu Hokka, José Geraldo da Cruz Pradella, Raquel de Lima Camargo Giordano, e Cláudio Alberto Torres Suazo, pelas sugestões e colaboração no desenvolvimento do trabalho.

Ao Departamento de Engenharia Química da UFSCar, pelas instalações e equipamentos.

Aos técnicos Maria Lucília Albano e Pedro Luiz Gallo, pelo apoio durante a execução do trabalho experimental.

Ao Raymundo Garbelotti Filho, pela confecção criteriosa dos desenhos deste trabalho.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Engenharia Química da UFSCar, que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

A Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação pela impressão deste trabalho.

INDICE

pág.

RESUMO	i
SUMMARY	ii
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	02
2.1. MATÉRIA-PRIMA	02
2.2. REAÇÃO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA	02
2.3. AGENTES SACARIFICANTES	06
2.4. FONTES AMILÁCEAS	10
2.4.1. Sorgo	10
2.4.2. Mandioca	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1.1. Enzimas utilizadas	16
3.1.2. Atividades das enzimas	16
3.1.3. Definição das atividades	16
3.2. MATÉRIA-PRIMA	17
3.3. EQUIPAMENTOS	17
3.4. DETERMINAÇÃO DOS AÇÚCARES REDUTORES (AR) DURANTE A REAÇÃO DE HIDRÓLISE	18
3.4.1. Procedimento analítico	18
3.5. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA DA α -AMILASE PA- RA LIQUEFAÇÃO DO AMIDO	19
3.5.1. Operação do Viscoamilógrafo	19
3.6. CONDIÇÕES DE pH E TEMPERATURA NO MEIO DE REAÇÃO	19
3.7. PREPARO DO MEIO DE REAÇÃO	20

3.8. PROCEDIMENTOS ADOTADOS	21
3.8.1. Procedimento I, alimentação em batelada	21
3.8.2. Procedimento II, alimentação intermitente	22
3.8.3. Procedimento III	22
3.8.4. Condições utilizadas nos ensaios	23
3.8.4.1. Alimentação em batelada	23
3.8.4.2. Alimentação intermitente	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1. ESCOLHA DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA DE α -AMILASE	25
4.2. RESULTADOS DE CONVERSÃO MÁXIMA OBTIDOS PARA ALIMENTAÇÃO EM BATELADA, COM TRÊS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE α -AMILASE	26
4.3. RESULTADOS OBTIDOS PARA ALIMENTAÇÃO INTERMITENTE	27
4.4. ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA FORMA DE ALIMENTAÇÃO NA CONVERSÃO E NA VELOCIDADE DE REAÇÃO ENZIMÁTICA DO AMIDO	27
5. CONCLUSÕES	29
6. SUGESTÕES	30
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37

ÍNDICE DE FIGURAS

pág.

FIGURA 1 : Amilogramas obtidos para a escolha da concentração mínima de α -amilase	31
FIGURA 2 : Concentração de açúcares redutores (AR) em função do tempo (θ) obtidos nos ensaios com alimentação em batelada	32
FIGURA 3 : Concentração de açúcares redutores (AR) em função do tempo (θ) obtidos nos ensaios com alimentação intermitente	33
FIGURA 4 : Concentração de açúcares redutores (AR) em função do tempo (θ). (O) alimentação em batelada; (Δ) alimentação intermitente	34
FIGURA 5 : Concentração de açúcares redutores (AR) em função do tempo (θ). (O) alimentação em batelada; (Δ) alimentação intermitente	35
FIGURA 6 : Concentração de açúcares redutores (AR) em função do tempo (θ). (O) alimentação em batelada; (Δ) alimentação intermitente	36

RESUMO

Estudou-se a influência de duas modalidades de alimentação de farinha de grãos de sorgo na hidrólise de amido, presente na mesma, a açúcares redutores, variando-se a concentração da enzima α -amilase e mantendo-se constante a concentração da amiloglicosidase. Utilizou-se um reator perfeitamente agitado com 1 litro de volume de trabalho, provido de controle de temperatura. Verificou-se conversão superior para os ensaios em que o amido foi alimentado de forma intermitente. Observou-se também, que a velocidade de reação, para a alimentação intermitente foi função da concentração de α -amilase, ao contrário do que aconteceu com alimentação em batelada. Observou-se ainda, que o efeito da reversibilidade da reação de sacarificação com alimentação em batelada foi comparativamente maior em relação à alimentação intermitente.

SUMMARY

The influence of two ways of sorghum flour feeding on the hydrolysis of starch to reducing sugar has been studied. The α -amylase concentration has been varied, and the concentration of glucoamylase has been kept constant. A perfect mixed batch reactor (1 % of working volume) with temperature control has been utilized. Higher conversions have been verified for tests in which the feeding has been carried out intermittently. It has been observed also, that the reaction rate, for intermittent feeding, was dependent on the α -amylase concentrations, whereas for the batch feeding this dependence has not occurred. Furthermore, it has been observed that the effect of the Saccharification reaction reversibility was relatively higher for batch feeding when compared with intermittent feeding.

1. INTRODUÇÃO

Na década de 70, uma das mais bem sucedidas experiências biotecnológicas, ocorreu com o processo de produção de etanol a partir da cana-de-açúcar.

Matérias-primas amiláceas têm também grandes possibilidades de aproveitamento biotecnológico, para a obtenção de produtos destinados à Agricultura, Saúde e Energia, após transformação do amido em açúcares fermentescíveis. Mandioca, milho, sorgo, batata doce, estão entre as matérias-primas que vem sendo mais frequentemente estudadas nos últimos anos.

Neste trabalho, utilizando-se amido de sorgo sacarino e tendo como parâmetro a conversão final do amido em açúcares redutores, procurou-se comparar as formas de alimentação em batelada e intermitente.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. MATÉRIA-PRIMA

O amido é um polímero da D-glicose com alto peso molecular, e é considerado como a principal fonte de energia para o desenvolvimento das plantas superiores. O amido é constituído principalmente de dois polímeros, denominados amilase e amilopectina. De acordo com a planta de origem o amido pode ter diferentes propriedades físicas e químicas, bem como a proporção de amilase e amilopectina pode variar^(6,47).

2.2. REAÇÃO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA

A reação de hidrólise enzimática do amido na presença das enzimas α -amilase e amiloglicosidase, ocorre por meio de uma reação série paralelo⁽²⁵⁾, na qual a α -amilase (endo-enzima)⁽⁶⁾, age sobre as macromoléculas do amido formando redutores (glicose e maltose) e dextrinas (oligossacarídeos), e a amiloglicosidase (exo-enzima)⁽⁶⁾ age sobre os finais não redutores das moléculas de dextrinas, proporcionando a formação de glicose. A ação da α -amilase se baseia no ataque exclusivo das ligações α -1,4 e da amiloglicosidase no ataque das ligações α -1,4 e α -1,6; quando o período de incubação do substrato com amiloglicosidase é longo, pode ocorrer reação reversa de glicose para oligossacarídeos⁽⁴⁹⁾.

ROELS, J.A. e TILBURG, R.⁽³⁹⁾ em 1979, desenvolveram um modelo cinético de reação para hidrólise de amido na

presença de amiloglicosidase. Os ensaios experimentais foram realizados usando como substrato amido, e glicose, no sentido de verificação da reação reversa de glicose em isomaltose e maltose. Eles observaram que as constantes de equilíbrio para a hidrólise das ligações α -1,4 e α -1,6 no amido são diferentes, justificando dessa forma o aparecimento predominante de isomaltose, quando soluções de dextrinas muito concentradas são incubadas na presença de amiloglicosidase.

KUSUNOKI, K. et alii⁽²³⁾ em 1982, propuseram uma expressão cinética para hidrólise enzimática do amido pela amiloglicosidase, baseado na equação de Michaelis-Menten modificada, com inibição pelo produto. Os ensaios experimentais foram realizados com dois tipos de amido em diferentes concentrações, e com maltose a diferentes concentrações. Os resultados experimentais foram utilizados para realizar simulação com a expressão cinética proposta, e concluíram que o efeito da inibição aumentava com o aumento do peso molecular do substrato.

BESCHKOV, V. et alii⁽¹⁰⁾ em 1984, estudaram a cinética de hidrólise de dextrinas (maltose e maltotriose) pela amiloglicosidase, e cinética da condensação de glicose em isomaltose e maltose. Com relação a hidrólise de maltose e maltotriose observaram que a conversão da solução de maltose (465 g/l) em glicose era muito rápida, e a redução na concentração da maltotriose era lenta. Para tempo de reação superior a 20 horas, a concentração de glicose diminuía, havendo formação significativa de isomaltose e o equilíbrio da reação se dava após 150 horas, com concentrações substanciais de glicose e isomaltose, e em muito menores proporções as concentrações de maltose e maltotriose. Com relação a cinética de condensação de

glicose, verificaram por meio de ensaios experimentais, com concentrações iniciais de glicose variando de 1,1M a 2,5M que a conversão em isomaltose era lenta. Para concentração de glicose mais alta, a concentração de isomaltose aumentava, e as concentrações finais de maltose e maltotriose eram sempre menores do que a da isomaltose.

ADACHI, S. et alii⁽¹⁾ em 1984, planejaram modelo cinético para hidrólise e síntese da maltose e isomaltose usando amiloglicosidases de duas origens *Rhizopus niveus* e *Aspergillus niger*. Eles concluíram que a condensação de glicose à maltose e à isomaltose ocorria por meio de reações paralelas reversíveis para ambas enzimas e que a transferência do radical glicosil entre maltose e isomaltose não era observada. O modelo proposto pelos autores, considerou que a amiloglicosidase possuía 2 subsítios, e que o sítio catalítico era localizado entre os 2 subsítios. A amiloglicosidase promovia rápida formação de maltose e lenta síntese de isomaltose, porém a quantidade produzida de isomaltose era superior à da maltose. Sugeriram que a condensação de glicose a dissacarídeos, especialmente a isomaltose, eram a causa dos oligossacarídeos residuais na sacarificação do amido.

SHIRAIISHI, F. et alii⁽⁴²⁾ em 1985, interessados em investigar os efeitos da concentração inicial de amido e a origem da amiloglicosidase sobre a cinética de reversão da glicose em maltose e isomaltose, propuseram um modelo cinético de reação, onde consideraram que toda a maltose produzida era proveniente da condensação da glicose, e que somente a isomaltose e maltose eram produzidas devido à reação reversa. Foram utilizadas concentrações iniciais de amido de 364 g/l e 104 g/l.

Eles observaram que a formação de glicose diminuía e isomaltose era revertida com a elevação da concentração inicial de amido e com longos tempos de reação, devido às reações reversas favorecerem a condensação de glicose à maltose e isomaltose. Com relação à natureza da amiloglicosidase, verificaram que a velocidade de reversão pela amiloglicosidase do *Aspergillus niger* era três vezes maior, significando que a enzima do *Rhizopus niveus* tem atividade menor de α -glicosidase.

FUJII, M. e KAWAMURA, Y.⁽²⁰⁾ em 1985, propuseram a modelagem de equações da cinética de hidrólise de amido, levando em conta a ação sinérgica da α -amilase e amiloglicosidase. Eles concluíram após realização de ensaios experimentais e simulação, que o papel da α -amilase era acelerar a velocidade de formação de glicose através de formação de novas moléculas de substrato para a ação da amiloglicosidase no estágio inicial da reação. Esta é a ação sinérgica. A ação acontece até que o peso molecular do substrato atinge uma redução no valor de aproximadamente 5000. Após este ponto, a ação da α -amilase pode ser desconsiderada, e a cinética é expressa somente pela equação de velocidade de reação da amiloglicosidase.

Vários boletins do NOVO INDUSTRI^(5,40,34), relataram sobre a cinética de reação de hidrólise enzimática de amido, onde afirmaram que na etapa de sacarificação do amido, onde atua a amiloglicosidase, aconteciam reações reversas, promovendo a formação de isomaltose, maltose, e redução na concentração de glicose produzida. Além disso, comunicaram que para se obter xarope de glicose num processo em batelada, a concentração máxima de amido a ser manipulada depende da eficiência do

agitador, e que concentrações maiores de glicose podem ser atingidas se a reação for iniciada com concentração baixa de amido, e o restante do mesmo adicionado gradualmente durante o processamento da reação.

2.3. AGENTES SACARIFICANTES

Em 1945, UNDERKOFER, G.M. et alii⁽⁴⁸⁾ fizeram estudos comparativos com relação à produção de álcool a partir de material amiláceo, testando como agentes sacarificantes o malte, o farelo fúngico, e a combinação de ambos. Eles concluíram que a produção de álcool utilizando material amiláceo sacarificado com farelo fúngico era aproximadamente 2% maior que quando eram utilizados os outros agentes sacarificantes.

CORMAN, J. e LANGLYKKE, A.F. ⁽¹³⁾ em 1948, investigaram a ação de enzimas fúngicas na sacarificação do amido para fermentação alcoólica, comparando com a utilização do malte com o mesmo objetivo de produzir álcool. Os resultados obtidos mostraram que certas linhagens de fungos onde ocorria não só a presença da enzima α -amilase como também de enzimas glucogênicas de alta atividade forneciam resultados de aproximadamente 40% maior em açúcares redutores em relação à utilização do malte como agente sacarificante.

Posteriormente em 1953, POOL, E.L. e UNDERKOFER, L. A. ⁽³⁷⁾ desenvolveram um trabalho sobre os agentes amilolíticos α -amilase e maltase, em algumas linhagens fúngicas cultivadas em farelo e em cultura submersa. Observaram um nível ótimo de produção de álcool para uma determinada linhagem fúngica, tanto

para a cultura submersa como para o cultivo no farelo, mostrando que a atividade da maltase era superior em relação às outras linhagens.

CORMAN, J. e TSUCHIVA, H.M.⁽¹⁴⁾ em 1951, confirmaram através de estudos que a produção de álcool a partir de material amiláceo utilizando amilase fúngica era função da atividade da maltase, desde que houvesse quantidade adequada de α -amilase presente. Verificaram ainda que a amilase fúngica com alto teor de maltase e baixo teor de α -amilase, se suplementada com malte, reduzia substancialmente a quantidade de amilase fúngica necessária para a hidrólise do amido.

DENAULT, L.J. e UNDERKOFER, L.A.⁽¹⁷⁾ em 1963 e CADMUS, M.C. et alii⁽¹¹⁾ em 1966, estudaram a produção de xarope de milho, fazendo a liquefação do amido por meio de α -amilase bacteriana, acompanhada da sacarificação até glicose utilizando enzima fúngica amiloglicosidase.

ASCHEGREEN, N.H.⁽⁴⁾ em 1969, relatou as vantagens da utilização das enzimas comerciais α -amilase bacteriana e amiloglicosidase fúngica como substitutas do malte, na hidrólise de material amiláceo, bem como a forma de ação das enzimas na molécula de amido visando a produção de álcool, concluindo que o uso da α -amilase bacteriana fornece uma produção de álcool de 1 a 3% maior do que quando se usa o malte. Além disso verificou que para a hidrólise de 1000 kg de amido, é necessário apenas 5 kg da enzima. Outra vantagem é que as preparações comerciais de enzimas amilolíticas são produzidas com atividades padronizadas, permitindo uma produção máxima de álcool. As enzimas são oferecidas no mercado a preços competitivos com

relação ao malte, o que representa uma grande economia. E, com relação a qualidade do produto e quanto a característica organoléptica, não difere do álcool produzido com o malte.

LÜTZEN, N.W.⁽²⁶⁾, em 1980, apresentou um estudo sobre o desenvolvimento de um novo processo para produção de álcool a partir de material amiláceo, onde realizou a liquefação e sacarificação do amido com enzimas α -amilase e amiloglicosidase em temperatura inferior à convencional, isto é, à temperatura de $\pm 30^{\circ}\text{C}$, que é a exigida para a fermentação, acontecendo uma redução no consumo de energia térmica, comparado com o processo convencional. Em função disso, o autor sugere que seja otimizado este processo, já que o mesmo apresenta uma economia de 10% da energia de combustão do álcool produzido.

HAGEN, H.A.⁽²¹⁾ em 1981, realizou um trabalho sobre produção de álcool a partir do amido, onde ele testou vários procedimentos na etapa de liquefação e sacarificação do amido, usando como agentes sacarificantes α -amilase e amiloglicosidase, com o objetivo de reduzir o consumo de energia. O autor fez ensaios com processo em batelada e contínuo. Dos procedimentos realizados com processo contínuo ele verificou que a economia de vapor era função direta não só dos percentuais de material amiláceo seco, bem como do aumento da temperatura de pré-aquecimento na etapa do "cozimento" (gelatinização e liquefação), apresentando na tabela os resultados obtidos.

CONSUMO DE ENERGIA NO COZIMENTO DO GRÃO

Processo	% material amiláceo seco	Temp.de en- trada no cozedor(°C)	Temp.de cozimento (°C)	Energia consumida (MJ/l etanol)
Batelada	20	20	150	5,3
Contínuo/Pré liquefação	30	85	150	1,7
Contínuo/Alta temperatura	35	85	150	1,4
Contínuo/Baixa temperatura	35	85	100	0,45

EL-SAIED, H.M. et alii⁽¹⁹⁾ em 1978, interessados na hidrólise enzimática de amido, fizeram determinações das velocidades de reação usando amilases bacterianas variadas. Dentre as enzimas ensaiadas, a α -amilase produzida pelo *Bacillus licheniformis* foi a que forneceu os melhores resultados quanto à estabilidade de sua atividade e resistência a altas temperaturas.

KEARSLEY, M.W. et alii⁽²²⁾ em 1980, visando o estudo da produção e propriedades do xarope de glicose, estudaram a influência de certos íons metálicos como cloretos de Ca e Zn, nitrato de chumbo, ligas de níquel/alumínio, nas atividades das enzimas α -amilase e amiloglicosidase, que são usadas para a degradação do amido. Eles conseguiram determinar que enquanto a

amiloglicosidase não é susceptível a ação dos íons citados, a α -amilase é bastante influenciável.

2.4. FONTES AMILÁCEAS

2.4.1. Sorgo

ARAKAKI, T. et alii⁽²⁾, em 1976, apresentaram uma pesquisa sobre a produção de álcool a partir do sorgo sacarino, utilizando não só o caldo do colmo como também o grão como matéria-prima, chegando a resultados interessantes quando comparados à cana-de-açúcar. Enquanto a produção média com a cana-de-açúcar é de 70 litros de álcool por tonelada de cana, a produção com o sorgo (colmo e grão hidrolisado) fornece 110 litros de álcool por tonelada de planta. Eles afirmaram ser necessário uma maior vivência do ponto de vista agrônomo para o cultivo do sorgo, com o objetivo de se selecionar uma variedade de sorgo com elevada produtividade.

DAVIS, A.B. e HOSENEY, R.C.⁽¹⁶⁾, em 1979, trabalhando com três variedades de sorgo, verificaram que o teor de tanino presente no vegetal, era inversamente proporcional ao grau de maturação da planta. Eles evidenciaram este fato quando realizaram testes de inibição da α -amilase pelo tanino, utilizando grãos de sorgo com graus de maturação distintos.

BAUR, M.C. e ALEXANDRE, R.J.⁽⁹⁾ em 1979, desenvolveram uma metodologia para determinação do amido presente nos cereais realizando hidrólise enzimática do amido com enzimas comerciais da NOVO INDUSTRI, e enzimas da Miles, em substituição à hidrólise ácida. A gelatinização do amido foi feita a 100°C num curto espaço de tempo, a liquefação na presença da α -amilase realizada a 85°C, e a sacarificação por ação da amiloglicosidase à temperatura de 60°C. Os autores compararam esta metodologia com a metodologia da AACC "American Association of Cereal Chemists". Dentre os cereais testados, o sorgo foi um dos cereais utilizados, e os valores obtidos com relação a determinação do amido com o método da AACC e o método proposto pelos autores, forneceram 44,6% (base seca) e 44,0% (base seca) de amido, respectivamente.

SUBRAMANIAN, V. et alii⁽⁴⁵⁾ em 1980, desenvolveram um método para identificação dos açúcares presentes nos grãos de dez variedades de sorgo, onde a quantidade de açúcares solúveis contido no extrato da farinha do grão de sorgo foi estimada pelo método de DUBOIS et alii⁽¹⁸⁾ (1956), Fenol-ácido sulfúrico. Os açúcares identificados por eluição numa coluna Biogel, foram "stachyose", rafinose, sacarose, glicose e frutose, sendo que a ocorrência da sacarose era predominante nas variedades testadas. Os autores realizaram este trabalho visando a utilização mais adequada do sorgo para alimentação humana.

NEUCERE, N.J. e SUMRELL, G.⁽³²⁾ em 1980, realizaram um estudo sobre a composição de cinco variedades de grãos de sorgo, visando a possibilidade de utilização dos mesmos para nutrição humana. Os teores de ácidos graxos, açúcares livres e

taninos, eram diferentes para cada variedade, apesar destas terem sido cultivadas sob ponto de vista agrônômico, em condições semelhantes.

MAXSON, E.D. et alii⁽²⁷⁾ em 1973, conduziram um estudo de inibição de α -amilase pelo tanino presente em algumas variedades de grão de sorgo, afirmando que a inibição da α -amilase ocorria, em maiores proporções nas variedades de sorgo em que os grãos apresentavam coloração marrom.

A presença de tanino nos grãos de diversas variedades de sorgo, bem como a ação do tanino como inibidor da α -amilase foi pesquisada por DAIBER, K.H.⁽¹⁵⁾, em 1975. Os resultados obtidos mostraram que o grau de inibição da enzima presente no malte do sorgo, era função da concentração do tanino, tendo sido desaconselhado a utilização das variedades de sorgo com alto teor de tanino nas indústrias de bebidas, bem como no uso para nutrição animal.

SERRA, G.E.⁽⁴³⁾ em 1976, interessado em reduzir a ociosidade das usinas de álcool no período da entressafra da cana-de-açúcar, sugeriu o desenvolvimento de estudos a respeito da caracterização do sorgo sacarino estabelecendo dados de cultura, produção, composição, fisiologia e maturação no Brasil, já que o sorgo (colmo e grão) pode ser utilizado como matéria-prima para produção de álcool, chegando a atingir uma eficiência de 85%, a transformação de amido em álcool.

Da mesma forma MENEZES, T.J.B. et alii⁽³⁰⁾ em 1977, bem como ARAUJO, N.Q. et alii⁽³⁾ em 1977, também se posicionaram a favor do desenvolvimento de pesquisa sobre o sorgo (colmo e grão), visando a utilização do mesmo como matéria-prima

para produção de álcool, com a finalidade de aproveitar as instalações das usinas de álcool de cana-de-açúcar no período de entressafra, uma vez que o sorgo (colmo e grão) pode fornecer 110 litros de álcool por tonelada de sorgo.

2.4.2. Mandioca

BANZON, J. et alii⁽⁷⁾, em 1948, interessados na produção de álcool a partir de mandioca, desenvolveram um trabalho comparativo envolvendo várias alternativas para liquefação e sacarificação do amido da mandioca. Foram utilizadas as seguintes alternativas para converter o amido: hidrólise em meio ácido, malte de cevada ou enzimas bacterianas para a liquefação do amido e malte de cevada ou farelo fúngico para a sacarificação. Os autores concluíram que a utilização de enzimas bacterianas e do farelo fúngico forneceram resultados superiores na produção de álcool quando comparados com a utilização do malte de cevada.

TEIXEIRA, C. et alii⁽⁴⁶⁾, em 1950, empregando enzimas provenientes de cultura submersa de fungos em mosto de mandioca, conseguiram uma conversão de 90% do amido, e realizando um estudo comparativo para a produção de álcool, a partir da mandioca, utilizando farelo fúngico, malte de cevada e hidrólise ácida, obtiveram a conversão de amido a etanol de 80 a 85%; 70 a 74% e 43 a 74%, respectivamente.

PARK, Y.K. e PAPINI, R.S.⁽³⁵⁾, em 1970, desenvolveram um estudo para produção de xarope de glicose proveniente de amido de mandioca pelo processo enzima-enzima empregando α -amilase bacteriana de *Bacillus subtilis* NRRL B-941 para a liquefação

e a amiloglicosidase fúngica para a sacarificação do amido. A amiloglicosidase foi produzida por *Aspergillus niger* NRRL 3112 e *Aspergillus awamori* NRRL 3112 que apresentavam alta atividade de amiloglicosidase e baixa atividade de transglicosidase. Os autores concluíram que, como a temperatura ótima para ação da amiloglicosidase estava entre 60 e 70°C, a conversão efetuada a 70°C era incompleta devido à gradual inativação enzimática em relação ao tempo prolongado de incubação a essa temperatura.

PARK, Y.K. et alii⁽³⁶⁾, em 1971, desenvolveram um estudo para verificar a relação entre entumescimento de grãos de amido em suspensão aquosa com a elevação da temperatura, para então comparar a suscetibilidade do amido proveniente de 2 vegetais distintos, milho e mandioca, à ação da α -amilase bacteriana obtida de *Bacillus subtilis*. Eles observaram que o amido de mandioca é mais susceptível ao ataque da α -amilase.

A utilização da mandioca como matéria-prima para produção de álcool etílico também foi estudada por MENEZES, T. J.B.⁽²⁹⁾, em 1978, que descreveu as etapas necessárias para obtenção de açúcares fermentescíveis, a partir do amido, por via ácida-enzimática. O autor ainda se referiu à possibilidade da utilização da celulase agindo sobre os componentes lignocelulósicos presentes na raiz da mandioca, facilitando a ação da α -amilase.

NIELSEN, B.H. e ROSENDAL, P.⁽³³⁾, em 1981, selecionaram a mandioca e o milho como fonte de amido, para estudar um processo alternativo para obtenção de álcool carburante, visando a redução do consumo de energia para liquefação do amido,

utilizando enzimas microbianas, em substituição ao malte.

BARBOSA, V.⁽⁸⁾, em 1981, realizou uma pesquisa para obtenção de álcool a partir da mandioca, usando enzimas microbianas para a transformação do amido em açúcares fermentescíveis. O autor observou a possibilidade de realização da liquefação e sacarificação do amido simultaneamente com a fermentação alcoólica à temperatura de 30°C, como também otimizou a concentração de α -amilase necessária para liquefação do amido.

UEDA, S. et alii⁽⁴⁷⁾, em 1980, realizaram ensaios de fermentação alcoólica a partir de amido de mandioca, utilizando um processo alternativo, em que a liquefação e sacarificação do amido ocorriam em paralelo com a fermentação, tendo conseguido atingir um nível de produção de álcool de $\pm 90\%$.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.1. Enzimas utilizadas

Foram utilizadas as enzimas TERMAMYL 120-AAN 1264 (α -amilase bacteriana termoestável) e AMYLOGLICOSIDASE NOVO 200L-ASN 5125 (amiloglicosidase fúngica termoestável), fornecidas pela NOVO INDUSTRI DO BRASIL.

3.1.2. Atividades das enzimas

Foram consideradas as atividades fornecidas pela NOVO
INDUSTRI.

. α -amilase: atividade declarada : 120 KNU/g
atividade real : 133,4 KNU/g

. amiloglicosidase:atividade declarada: 200 AGU/ml
atividade real : 215 AGU/ml

3.1.3. Definição das atividades

1 KNU é a quantidade de enzima que dextriniza 5,26g por hora de amido solúvel da MERCK nas condições de pH 5,6; temperatura de 37°C; tempo de reação de 7 a 20 minutos, com 0,0043M de cálcio presente.

1 AGU é a quantidade de enzima que sacarifica 1 μ mol de maltose por minuto, nas condições de pH 4,3; temperatura de 25°C; substrato de maltose a 10g/l e tempo total de reação de 50 minutos.

3.2. MATÉRIA-PRIMA

Para os ensaios realizados utilizou-se farinha de grão de sorgo, variedade BRANDES, obtido na Estação Experimental "Presidente Médici"-Lageado em Botucatu, S.P., fornecido pelo Departamento de Agricultura da Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, Campus de Botucatu.

A caracterização da farinha foi realizada no laboratório do Instituto Adolfo Lutz, seção de doces e amiláceos em São Paulo.

ANÁLISE QUANTITATIVA DA FARINHA	valor médio
. teor de amido	81,45%
. teor de fibras	4,04%
. teor de cinzas	1,31%
. umidade	9,00%

ANÁLISE QUALITATIVA DA FARINHA

. maltose	presente
. rafinose	traços
. sacarose	traços
. frutose	presente
. glicose	traços

3.3. EQUIPAMENTOS

- Espectrofotômetro MICRONAL B29511.
- Agitador FANEM - mod. 256/E - KW 0,4.
- Centrífuga FANEM - mod. 204 NR

- Medidor de pH PROCYON - mod. PHN-4.
- Banho termostático FANEM-UNITEMP, mod. 112 - KW 1,000.
- Balança semi-analítica METTLER P1210.
- Balança analítica METTLER H35AR.
- Viscoamilôgrafo BRABENDER.
- Tanque de aço inox.
- Materiais usuais de laboratório.

3.4. DETERMINAÇÃO DOS AÇÚCARES REDUTORES (AR) DURANTE A REAÇÃO DE HIDRÓLISE

Utilizou-se o método de redução do 3-5 ácido dinitrosalicílico (DNS)⁽³¹⁾.

3.4.1. Procedimento analítico

A 1ml da amostra de AR adequadamente diluída, foram adicionados 2ml da solução de DNS num tubo de ensaio follin-wu de 25ml. Esta mistura foi colocada num banho-maria em ebulição por 5 minutos e em seguida foi resfriada em água corrente.

O volume da mistura contida no tubo follin-wu foi elevado até 25ml com água destilada e homogeneizado.

Fez-se a leitura da transmitância da solução de AR em espectrofotômetro a 540 nanômetros. Para cálculo da concentração, foi realizada uma curva de calibração utilizando soluções de glicose P.A. com concentração de 0,1g/l a 1,0g/l.

3.5. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA DA α -AMILASE PARA LIQUEFAÇÃO DO AMIDO

Foram realizadas diversas medidas operando-se um viscoamilógrafo, com diferentes concentrações de α -amilase e paralelamente foram obtidas a temperatura de gelatinização do amido contido na farinha e a viscosidade em função do tempo. De acordo com SADDY, M. e FILHO, A.S.⁽⁴¹⁾ nas reações de liquefação de amido, o aumento da concentração de α -amilase resulta em aumento da conversão de amido, e portanto, a determinação da concentração mínima é necessária, por se tratar de enzimas livres no meio reacional, não recuperáveis e de alto custo.

3.5.1. Operação do Viscoamilógrafo

No recipiente do viscoamilógrafo foram colocados 450 ml de suspensão aquosa de farinha, à concentração de 200g/l, sendo o pH ajustado em 6,5. Adicionou-se a enzima em concentração determinada. A agitação do viscoamilógrafo foi fixada em 75 rpm e a temperatura inicial do banho ajustada em 25°C.

Uma vez acionado o equipamento, a temperatura foi aumentando à velocidade de 1,5°C/min, obtendo-se simultaneamente as medidas da viscosidade, que aumenta em relação ao tempo, até um certo valor, após o qual, a viscosidade começa a diminuir. Para cada concentração da enzima empregada, as viscosidades máximas atingidas foram registradas.

3.6. CONDIÇÕES DE pH E TEMPERATURA NO MEIO DE REAÇÃO

Para realização da reação enzimática, na etapa da liquefação do amido pela ação da α -amilase, o pH 6,5 foi mantido.

Na etapa de sacarificação do amido, pela ação da amiloglicosidase foi mantido pH 4,0 e a temperatura do banho a 60°C. Estes valores de pH foram usados tomando por base especificações das enzimas fornecidas pelo próprio fabricante.

Para a etapa de liquefação do amido, além de terem sido utilizadas as especificações fornecidas pelo fabricante das enzimas, foram realizados testes preliminares, para verificação da velocidade de gelatinização do amido contido na farinha, na ausência de α -amilase, mantendo a suspensão aquosa de farinha a 200g/l sob agitação, em banho com temperatura controlada, onde se testaram alguns valores de temperatura. Dentre as temperatura testadas, a de 80°C foi a que proporcionou maior velocidade de gelatinização.

De acordo com CIACCO, C.F. e CRUZ, R.⁽¹²⁾, a eficiência da hidrólise enzimática também depende da temperatura de gelatinização do amido. Como a susceptibilidade do grânulo aumenta com a gelatinização, deve-se hidrolisar o amido a uma temperatura acima da temperatura de gelatinização, desde que adequada à resistência térmica da enzima. Neste trabalho, os ensaios foram realizados a 80°C $\pm$ 1°C, sendo que a temperatura de gelatinização obtida com o uso do viscoamilógrafo foi de 70°C.

3.7. PREPARO DO MEIO DE REAÇÃO

Para os ensaios realizados utilizou-se suspensão aquosa de farinha de grão de sorgo sacarino à concentração de 200g/l.

Para a primeira hora de reação, correspondente à ação da α -amilase, utilizou-se hidróxido de sódio 2N para o ajuste do pH em 6,5, e a temperatura mantida em $80^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Após a ação da α -amilase, o pH era ajustado para 4,0 com H_2SO_4 10% V/V, e a temperatura para $60^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, condições necessárias para a ação da amiloglicosidase.

A reação foi realizada num tanque de aço inox agitado, de capacidade de 1300ml, imerso em banho termostatizado.

3.8. PROCEDIMENTOS ADOTADOS

Foram realizados vários testes preliminares com alimentação de matéria-prima em batelada usando diversas concentrações da enzima em diferentes etapas, a fim de selecionar os procedimentos experimentais mais favoráveis.

Para a liquefação ou dextrinização foram adotados os procedimentos I e II, e para a sacarificação o procedimento III.

3.8.1. Procedimento I, alimentação em batelada

O tanque com 1000ml de suspensão a 200g/l e pH 6,5, acrescido de metade do volume de α -amilase a ser utilizada, foi colocado em banho-maria à temperatura de $80^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, e no instante em que houve o aumento da viscosidade (aproximadamente 10 minutos) o restante da α -amilase foi adicionada, e a reação se processou por uma hora. O tempo necessário para que a viscosidade começasse a reduzir (observação visual) foi de aproximadamente 15 minutos.

As concentrações de α -amilase utilizadas foram as seguintes: $4,9110.10^{-4}$ ml enzimas/g amido; $9,8220.10^{-4}$ ml enzima/g amido e $6,1387.10^{-3}$ ml enzima/g amido.

3.8.2. Procedimento II, alimentação intermitente

O tanque contendo água e α -amilase, num pH 6,5, foi colocado no banho-maria a 80°C . A farinha foi alimentada de maneira intermitente em porções de 10 gramas em cada 2 minutos aproximadamente, até atingir a concentração de 200g/l. A reação se processou por uma hora, contada a partir do tempo em que foi adicionada a primeira porção de farinha. Foi observado visualmente, que a viscosidade máxima atingida pela suspensão foi menor que a ocorrida no procedimento I, ficando garantida a homogeneidade do meio de reação. As concentrações de α -amila se empregadas foram as seguintes: $3,6832.10^{-4}$ ml enzima/g amido; $9,8220.10^{-4}$ ml enzima/g amido e $6,1387.10^{-3}$ ml enzima/g amido.

3.8.3. Procedimento III

Após uma hora de ação da α -amilase, tanto para o procedimento I como para o procedimento II, a temperatura do banho foi ajustada para 60°C , o pH para 4,0 e a amiloglicosidase na concentração de $2,4555.10^{-3}$ ml enzima/g amido foi adicionada, processando-se a reação por 20 horas. Todos os ensaios foram realizados para as três diferentes concentrações de α -amilase, mantendo-se inalterada a concentração de amiloglicosidase.

A concentração mínima de α -amilase empregada, foi resultante do estudo realizado quando se operou o viscoamilógrafo.

Acompanhou-se a reação de todos os ensaios a partir do instante em que foi adicionada a amiloglicosidase, por meio da determinação de açúcares redutores provenientes da conversão do amido, contra o tempo. As amostras coletadas foram tratadas com hidróxido de sódio 2N, para inativação das enzimas, e em seguida centrifugadas.

A formação dos açúcares redutores foi detectada mediante dosagem dos mesmos, no sobrenadante proveniente da centrifugação, com o método do DNS e a concentração de amido no decorrer do processo foi calculada pela expressão: $F \cdot AX - AR \cdot 0,9$, onde F é a concentração inicial da suspensão aquosa de farinha, AX é o teor de amido na farinha e AR concentração de açúcares redutores, 0,9 é o fator de conversão de AR para amido⁽³⁸⁾.

3.8.4. Condições utilizadas nos ensaios

3.8.4.1. Alimentação em batelada

ensaio	α -amilase mℓ enzima g amido	amiloglicosidase mℓ enzima g amido	teor de amido na farinha (%)	suspensão de farinha em água (g/ℓ)
1	$4,9110 \cdot 10^{-4}$	$2,4555 \cdot 10^{-3}$	81,45	200
2	$9,8220 \cdot 10^{-4}$	$2,4555 \cdot 10^{-3}$	81,45	200
3	$6,1387 \cdot 10^{-3}$	$2,4555 \cdot 10^{-3}$	81,45	200

3.8.4.2. Alimentação intermitente

en saio	α -amilase $\frac{\text{ml enzima}}{\text{g amido}}$	amiloglicosidase $\frac{\text{ml enzima}}{\text{g amido}}$	teor de amido na farinha (%)	suspensão de fa rinha em água (g/l)
4	$3,6832 \cdot 10^{-4}$	$2,4555 \cdot 10^{-3}$	81,45	200
5	$9,8220 \cdot 10^{-4}$	$2,4555 \cdot 10^{-3}$	81,45	200
6	$6,1387 \cdot 10^{-3}$	$2,4555 \cdot 10^{-3}$	81,45	200

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ESCOLHA DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA DE α -AMILASE

A fim de escolher a concentração mínima de α -amilase para dextrinização do amido foi utilizado o viscoamilógrafo Brabender, operando nas seguintes condições: concentração da suspensão aquosa de farinha 200g/l, temperatura inicial 25°C, volume da suspensão 450ml, agitação 75 rpm e pH 6,5. Obtiveram-se os resultados apresentados na tabela 1 e figura 1.

TABELA 1 : Ensaio para escolha da concentração mínima de α -amilase necessária para dextrinização do amido, usando viscoamilógrafo Brabender

ensaio	volume enzima (ml)	diluição da enzima	conc. α -amilase $\frac{\text{ml enzima}}{\text{g amido}}$	viscos. máxima (UB)	temp.de pasta (°C)	temp. à viscos.má- xima(°C)
1	0,2	pura	$2,7657 \cdot 10^{-3}$	40		
2	3,0	1:500	$8,2970 \cdot 10^{-5}$	860		
3	4,0	1:500	$1,1063 \cdot 10^{-4}$	510		
4	8,0	1:500	$2,2125 \cdot 10^{-4}$	390	± 62	± 70
5	10,0	1:500	$2,7656 \cdot 10^{-4}$	310		
6	13,0	1:500	$3,5954 \cdot 10^{-4}$	220		
7	15,0	1:500	$4,1485 \cdot 10^{-4}$	180		

O critério adotado para decidir sobre a concentração mínima de α -amilase a ser empregada, foi o de tentar utilizar uma concentração inferior ou igual às recomendadas por SADDY, M. e FILHO, A.S. ⁽⁴¹⁾ e pelo Boletim Informativo ⁽³⁴⁾ por razões

já citadas anteriormente no item 3.5, porém garantindo um meio reacional de baixa viscosidade, facilmente manipulável e de composição uniforme.

Dentre as concentrações de α -amilase testadas, a concentração $4,1485 \cdot 10^{-4}$ ml de α -amilase por grama de amido foi escolhida como limite inferior de utilização para reação de hidrólise enzimática.

Foi observado também que nas condições realizadas, as temperaturas de pasta (temperatura do início da gelatinização) e, as atingidas quando a viscosidade atingiu valor máximo, independeram das concentrações de α -amilase nas condições realizadas (tabela 1).

4.2. RESULTADOS DE CONVERSÃO MÁXIMA OBTIDOS PARA ALIMENTAÇÃO EM BATELADA, COM TRÊS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE α -AMILASE

Na figura 2, apresentam-se os resultados obtidos através dos três ensaios cujas concentrações de α -amilase foram $4,9110 \cdot 10^{-4}$ ml enzima/g amido; $9,8220 \cdot 10^{-4}$ ml enzima/g amido e $6,1387 \cdot 10^{-3}$ ml enzima/g amido. Observa-se que a conversão máxima atingida para estas concentrações, foi praticamente a mesma.

A velocidade de reação para a concentração inferior de α -amilase foi menor que a velocidade de reação ocorrida para as outras duas concentrações.

4.3. RESULTADOS OBTIDOS PARA ALIMENTAÇÃO INTERMITENTE

Nos experimentos realizados com as concentrações de α -amilase de $3,6832 \cdot 10^{-4}$ ml enzima/g amido; $9,8220 \cdot 10^{-4}$ ml enzima/g amido e $6,1387 \cdot 10^{-3}$ ml enzima/g amido, observa-se na figura 3 que houve um acréscimo na conversão e na velocidade de reação com a elevação da concentração de α -amilase.

4.4. ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA FORMA DE ALIMENTAÇÃO NA CONVERSÃO E NA VELOCIDADE DE REAÇÃO ENZIMÁTICA DO AMIDO

Os gráficos das figuras 4 e 5 mostram que para uma mesma concentração de α -amilase, o nível de conversão e velocidade de reação enzimática atingiu maiores valores nos casos em que foi feita a alimentação intermitente. A figura 6 confirma este resultado, tendo sido usada concentração de α -amilase no ensaio com alimentação intermitente, inferior à concentração de α -amilase usada quando a alimentação era em batelada.

Observa-se a partir destes resultados que a mudança de procedimento para alimentação do tanque de reação nas condições estudadas, de batelada para intermitente, influenciou de forma significativa o equilíbrio químico da reação.

Os autores ADACHI, S. et alii⁽¹⁾; BESCHKOV, V. et alii⁽¹⁰⁾; SHIRAIISHI, F. et alii⁽⁴²⁾ e FUJII, M. e KAWAMURA, Y.⁽²⁰⁾, observaram que junto com a formação de glicose a partir da reação de hidrólise de amido pela amiloglicosidase, acontecia formação também de outros produtos. Este fenômeno foi verificado, promovendo-se a reação para tempos grandes, até alcançar o equilíbrio, quando se observava uma redução na concentração de glicose. Este fato foi explicado considerando que a reação de

hidrólise enzimática pela amiloglicosidase é reversível. No início da reação acontece rápida formação de glicose, e a partir de uma certa concentração de glicose acumulada acontece a reversibilidade da reação aparecendo isomaltose e maltose. ADA CHI, et alii⁽¹⁾ provam por meio de experimentos que as reações reversas de glicose a maltose e isomaltose são paralelas, sendo que a quantidade de isomaltose formada é bem superior à quantidade de maltose.

Neste trabalho, observando-se as curvas obtidas experimentalmente e comparando com as obtidas pelos autores citados, conclui-se que para a alimentação em batelada, a concentração de amido era alta e constante desde o início da reação, o que possibilitou uma rápida formação de glicose num valor tal que propiciou de maneira positiva a reversibilidade da reação e, portanto, a conversão de amido em glicose para as três concentrações de α -amilase utilizadas, atingiram aproximadamente um mesmo valor, por volta de 146g/l de açúcares redutores. Com a alimentação intermitente, apesar da concentração de amido utilizada ter sido a mesma, o início da reação se deu com baixa concentração de amido, que foi aumentando gradativamente em relação ao tempo; desta maneira, o efeito da reversibilidade foi retardado, possibilitando uma conversão superior de amido, por volta de 180g/l para a mais alta concentração de α -amilase utilizada. Estes dados estão de acordo com SHIRAISHI, F. et alii⁽⁴²⁾ e boletins da NOVO INDUSTRIA^(5,34,40) que apresentam curvas experimentais de hidrólise de amido, variando as concentrações iniciais de amido. Para a concentração superior de amido utilizada, ele obteve maior concentração de glicose.

As concentrações de AR no tempo zero encontradas nas figuras 2 e 3, são diferentes, devido às diferentes concentrações de α -amilase empregadas.

5. CONCLUSÕES

Dentro das condições experimentais e com os resultados obtidos no trabalho, concluímos que a alimentação intermitente quando comparada com a alimentação em batelada, propiciou:

1. Velocidades de reação de hidrólise superiores e dependentes da concentração de α -amilase.
2. Conversão superior de amido em açúcares redutores, devido ao retardamento do efeito da reação de reversibilidade da reação de hidrólise enzimática na etapa de sacarificação.
3. Meio reacional uniforme e de baixa viscosidade, na fase da liquefação do amido. Esta observação foi feita visualmente.

6. SUGESTÕES

1. Novos experimentos deverão ser realizados uniformizando a metodologia de adição da α -amilase para os procedimentos da alimentação.
2. A influência de inibidores, presentes em algumas variedades de sorgo, na atividade da α -amilase, deve ser estudada.
3. Estudos reológicos devem ser realizados, visando a economia de enzima, já que é um biocatalisador não recuperável.
4. Deve ser incentivado o programa agrônomo de produção do sorgo, para utilização como material amiláceo.

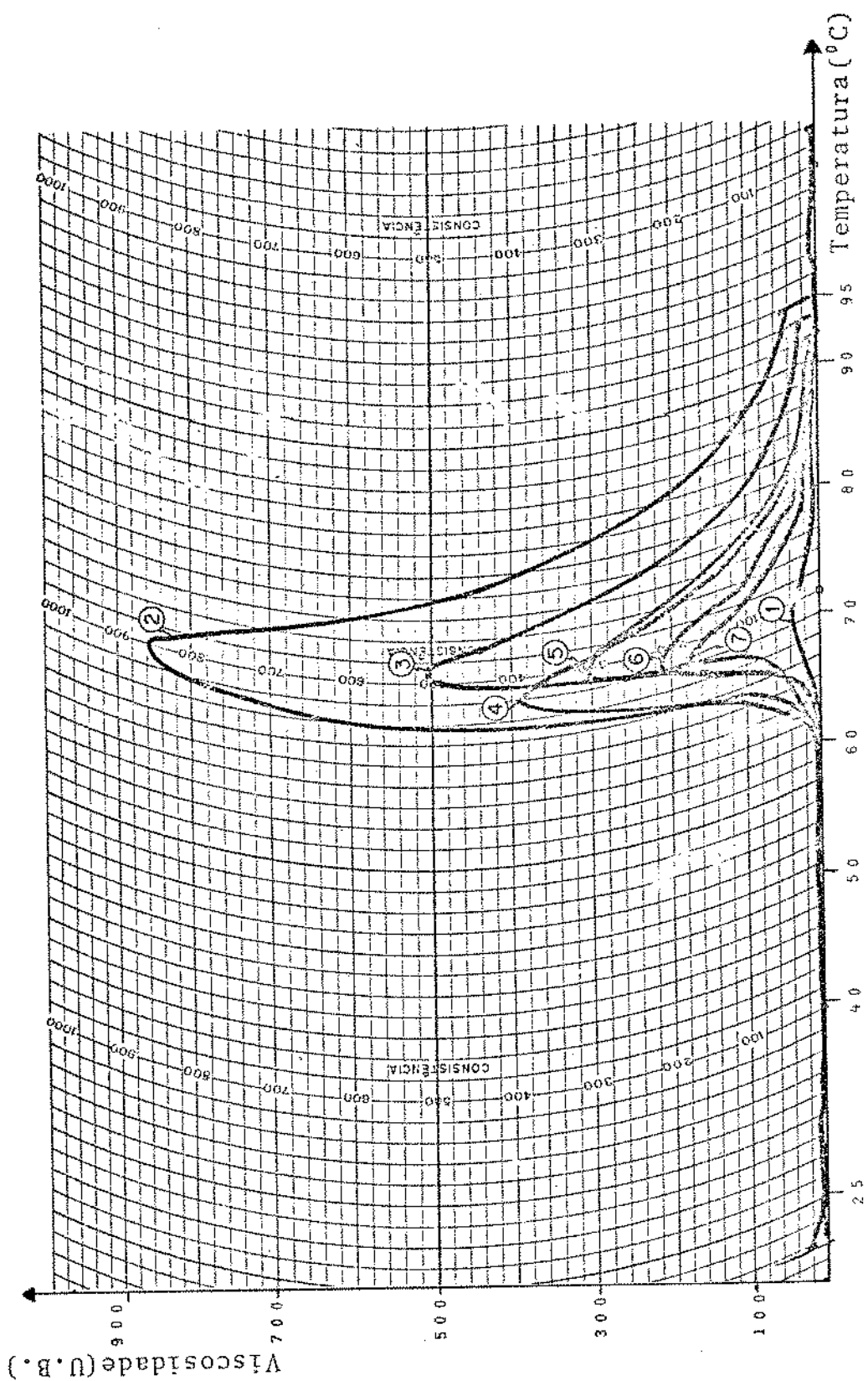


FIGURA 1 : Amilogramas obtidos para a escolha da concentração mínima de α -amilase. Condições dos experimentos: 1 a 7, ver tabela 1

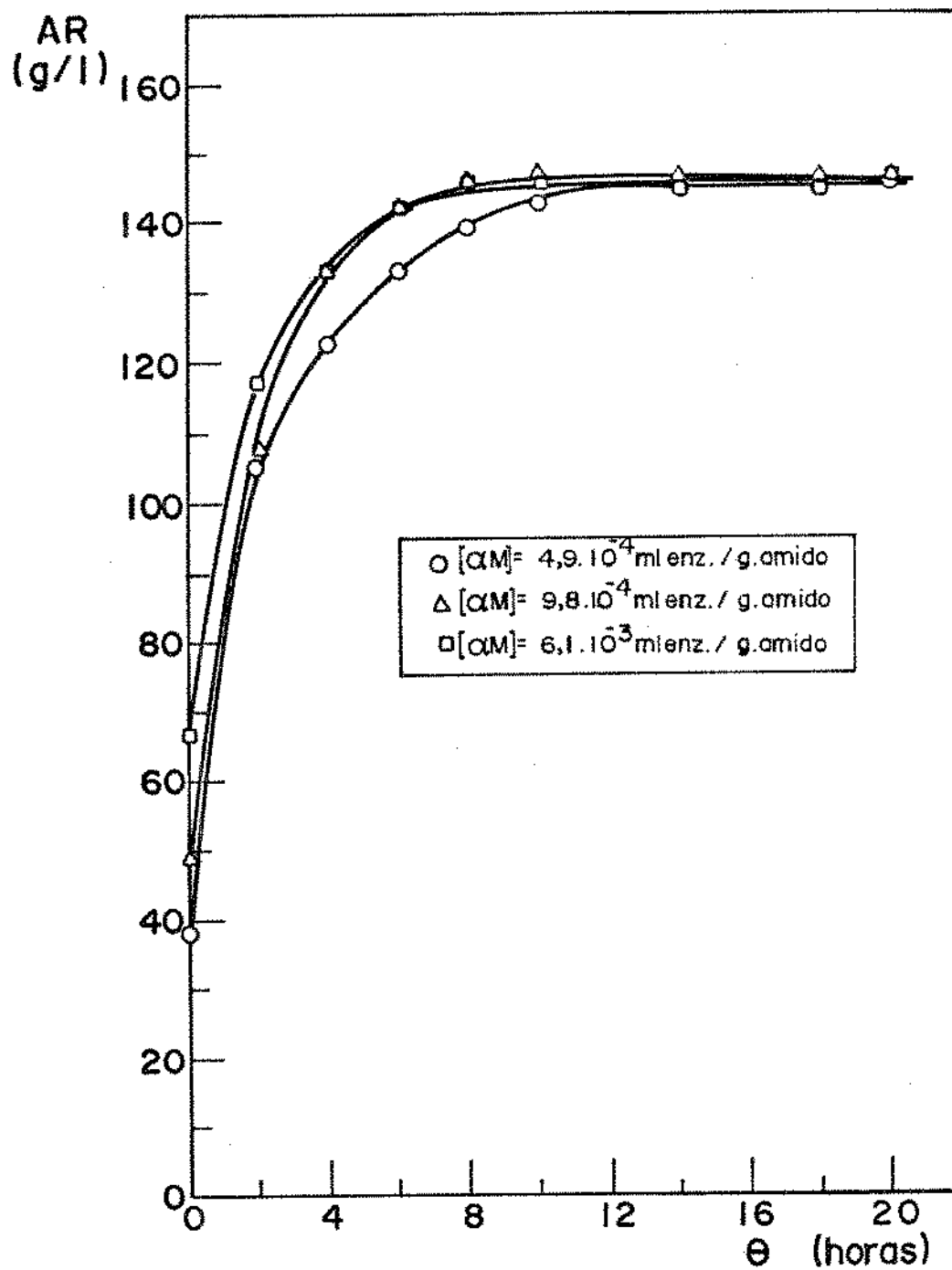


FIGURA 2 : Concentração de açúcares redutores (AR) em função do tempo (θ) obtidos nos ensaios com alimentação em batelada

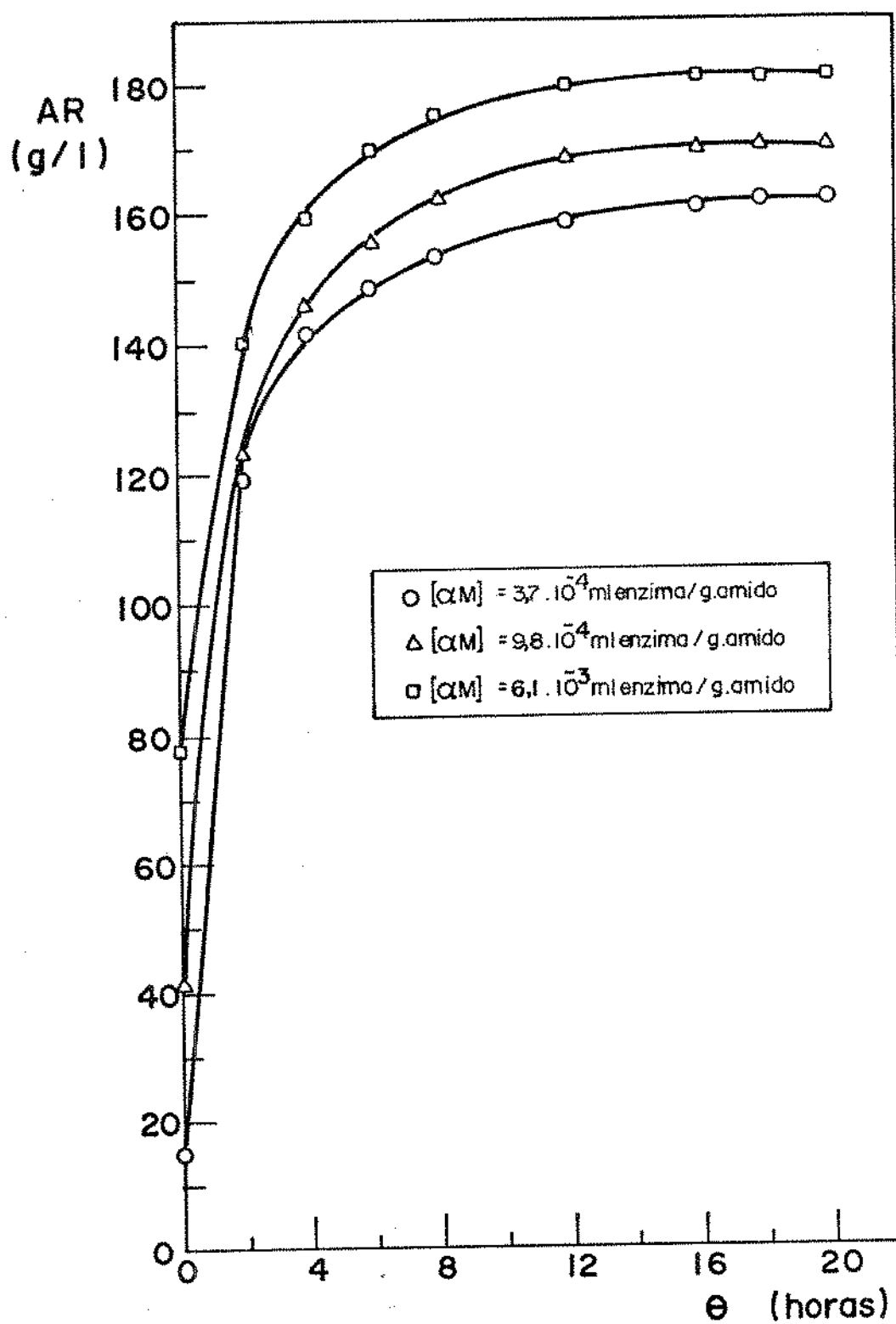


FIGURA 3 : Concentração de açúcares redutores (AR) em função do tempo (θ) obtidos nos ensaios com alimentação intermitente

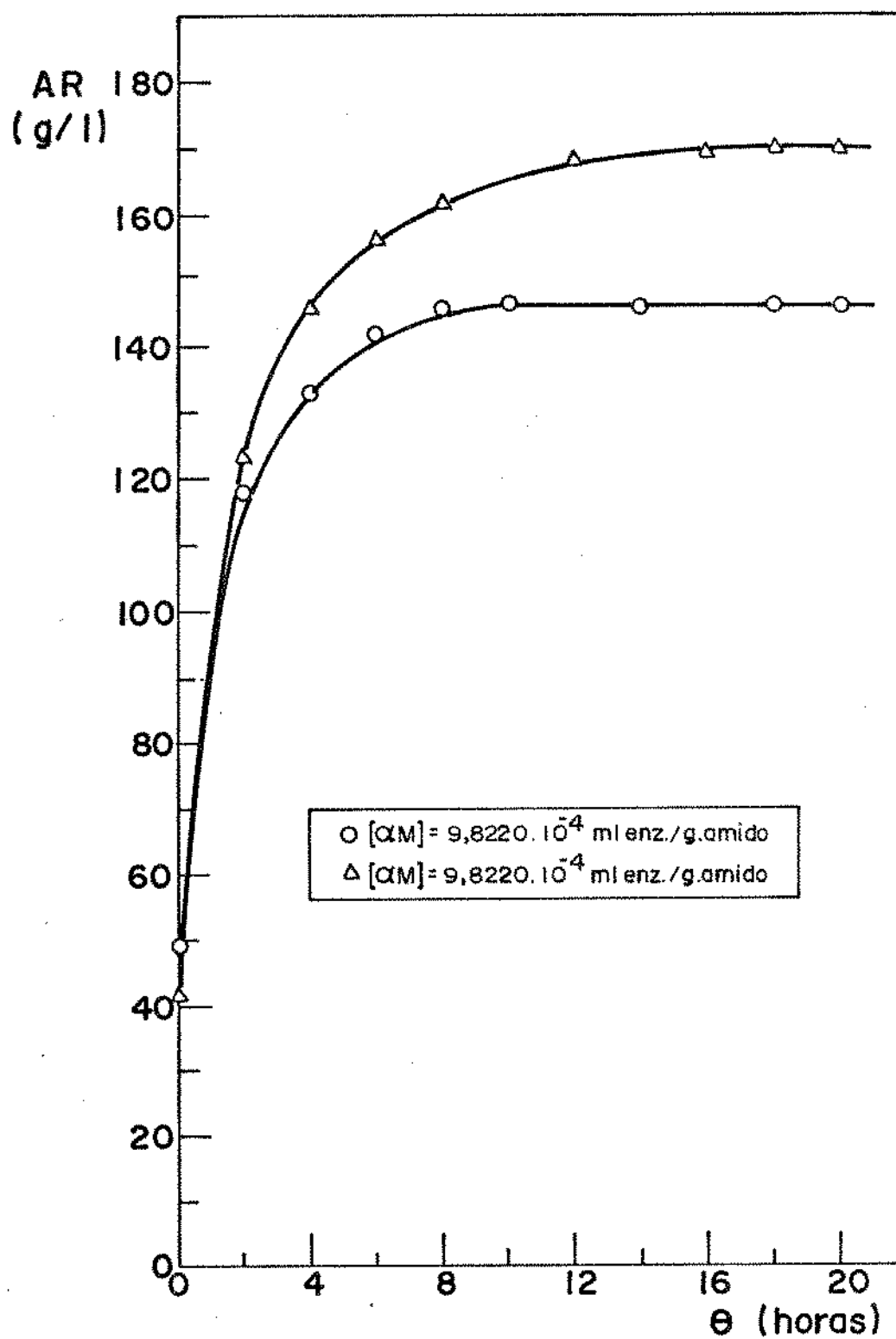


FIGURA 4 : Concentração de açúcares redutores (AR) em função do tempo (θ). (O) alimentação em batelada; (Δ) alimentação intermitente

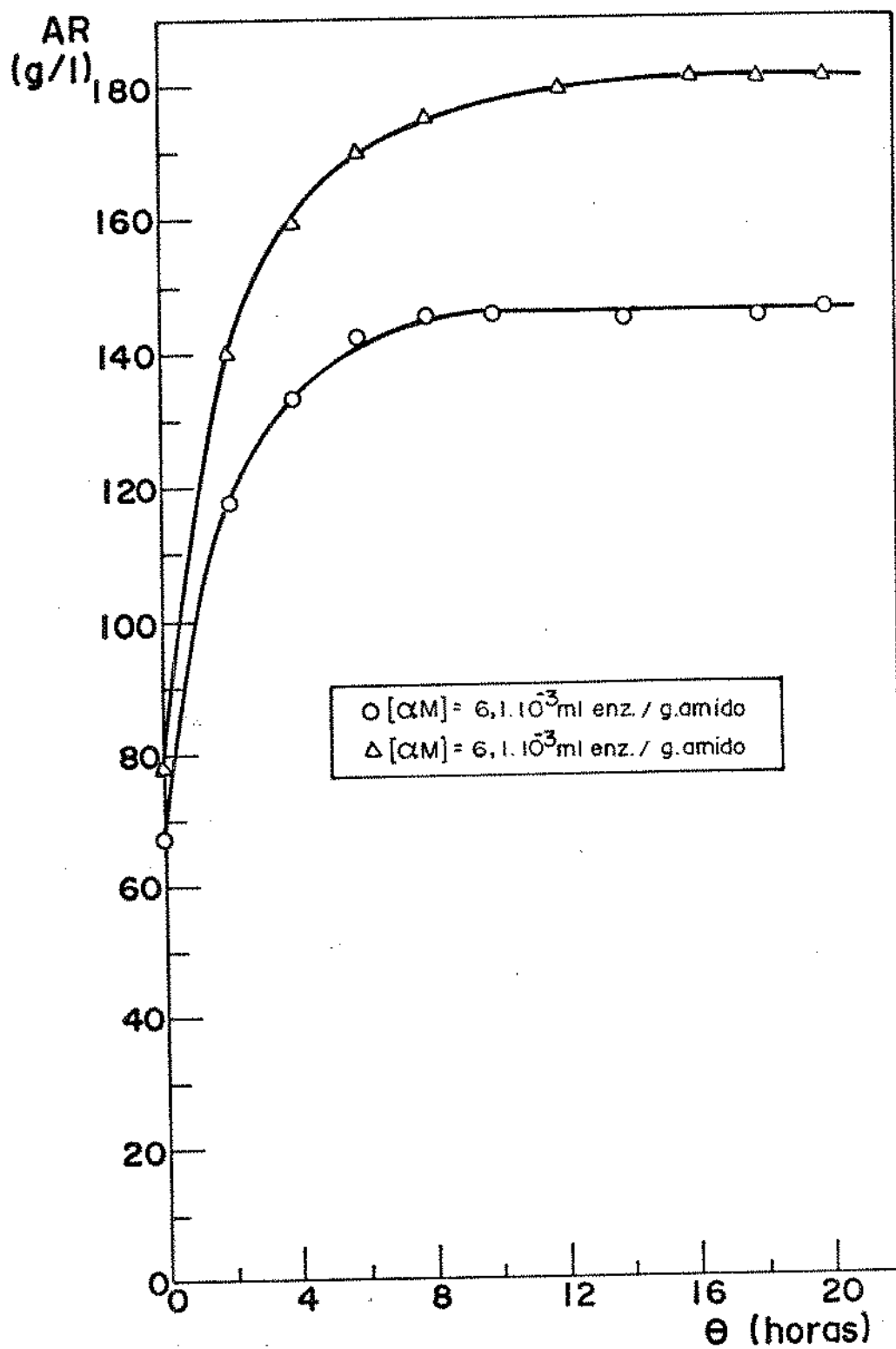


FIGURA 5 : Concentração de açúcares redutores (AR) em função do tempo (θ). (O) alimentação em batelada; (Δ) alimentação intermitente

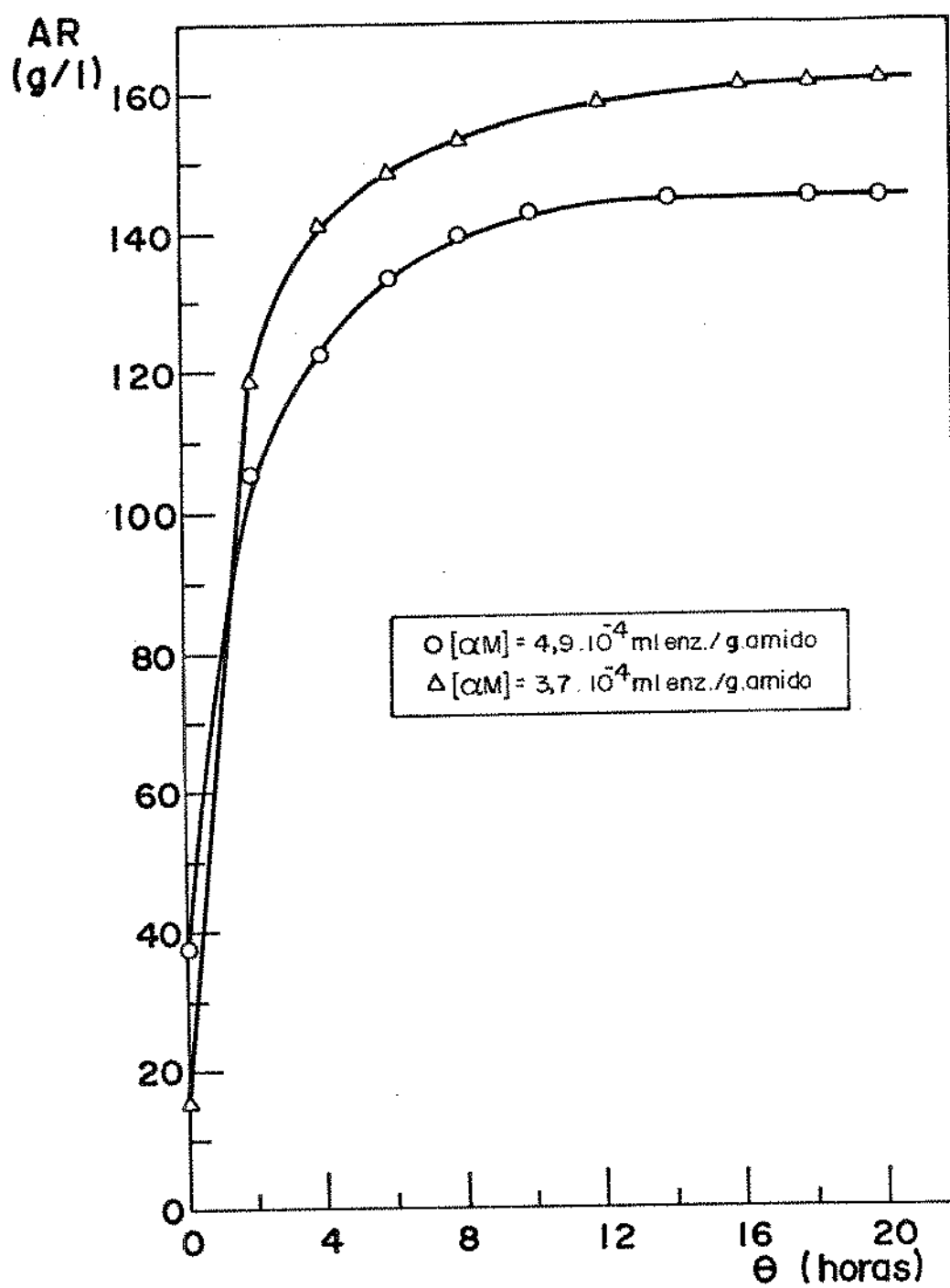


FIGURA 6 : Concentração de açúcares redutores (AR) em função do tempo (θ). (O) alimentação em batelada; (Δ) alimentação intermitente

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADACHI, S.; UEDA, Y.; HASHIMOTO, K. - Kinetics of formation of maltose and isomaltose through condensation of glucose by glucoamylase. Biotechnology and Bioengineering, 26(3): 121-27, 1984.
2. ARAKAKI, T.; DELAMO, P.R.; MENEZES, T.J.B.; PURCHIO, M.J.; TEIXEIRA, C.G. - Produção de álcool etílico de sorgo sacarino. I Simpósio Brasileiro de Sorgo, Brasília, março, 1977.
3. ARAUJO, N.Q. - Sorgo - matéria-prima renovável para produção de etanol na escalada energética nacional. Brasil Açucareiro, 23/41, agosto, 1977.
4. ASCHEENGREEN, N.H. - Microbial enzymes for alcohol production. Process Biochemistry, 4(8): 23-25, 1969.
5. ASCHENGREEN, N.H. - Enzyme processes in the production of sweeteners from starch. Seminar in Beijing Food Processing Exhibition, outubro, 1981.
6. BANKS, W. & GREENWOOD, C.T. - Starch and its components. John Wiley and Sons, 1975.
7. BANZON, J.; FULMER, E.I.; UNDERKOFER, L.A. - Fermentative utilization of Cassava the production of ethanol. J. Science, 23: 219-35, 1949.
8. BARBOSA, V. - Hidrólise ácida e enzimática de amido. 1º Congresso Brasileiro de Alcoolquímica, 1981.

9. BAUR, M.C. & ALEXANDER, R.J. - Enzymatic procedure for determination of starch in cereal products. Cereal Chemistry, 56(4): 364-366, 1979.
10. BESCHKOV, V.; MARC, A.; ENGASSER, J.M. - A kinetic model for the hydrolysis and synthesis of maltose, isomaltose, and maltotriose by glucoamylase. Biotechnology and Bioengineering, 26(1): 22-26, 1984.
11. CADMUS, M.C.; JAYKO, L.G.; SMILEY, K.L. - Enzymatic production of glucose syrup from grains and its use in fermentations. Cereal Chemistry, 43: 658-69, 1966.
12. CIACCO, C.F. & CRUZ, R. - Fabricação de amido e sua utilização. Série Tecnologia Agroindustrial, 1980.
13. CORMAN, J. & LANGLYKKE, A.F. - Action of mold enzymes in starch saccharification. Cereal Chemistry, 25: 190-201, 1948.
14. CORMAN, J. & TSUCHIYA, H.M. - Utilization of fungal amylase for alcohol production. Cereal Chemistry, 28: 280-288, 1951.
15. DAIBER, K.H. - Enzyme inhibition by polyphenols of sorghum grain and malt. J.Sci.Fd.Agric., 26: 1399-411, 1975.
16. DAVIS, A.B. & HOSENEY, R.C. - Grain sorghum condensed tannins. II. Preharvest changes. Cereal Chemistry, 56(4): 314-316, 1979.
17. DENAULT, L.J. & UNDERKOFER, L.A. - Conversion of starch by microbial enzymes for production of syrups and sugars. Cereal Chemistry, 40: 618-29, 1963.

18. DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REVERS, P.A.; SMITH, F. - Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, 28(3): 350-56, 1956.
19. EL-SAIED, H.M.; GHALI, Y.; GABR, S. - Rate of starch-hydrolysis by bacterial amylase. Starch/Stärke, 30(3): 96-98, 1978.
20. FUJII, M. & KAWAMURA, Y. - Synergistic action of α -amylase and glucoamylase on hydrolysis of starch. Biotechnology and Bioengineering, 27(3): 260-65, 1984.
21. HAGEN, H.A. - Production of ethanol from starch-containing crops - various cooking procedures. Meeting on Bio-Fuels in Bologna, F-810669/HAH/MF, 1981.
22. KEARSLEY, M.W.; SATTI, S.H.; TREGASKIS, I. - The production and properties of glucose syrups. Starch/Stärke, 32(5): 169-174, 1980.
23. KUSUNOKI, K.; KAWAKAMI, K.; SHIRAIISHI, F.; KATO, K.; KAI, M. - A kinetic expression for hydrolysis of soluble starch by glucoamylase. Biotechnology and Bioengineering, 24: 347-54, 1982.
24. LEACH, H.W. & SCHOCH, T.J. - Structure of the starch granule. Cereal Chemistry, 38: 34-46, 1961.
25. LEVENSPIEL, O. - Chemical reaction engineering. John Wiley and Sons, 1972.

26. LUTZEN, N.W. - Enzyme technology in the production of ethanol - recent process development. VIth International Fermentation Symposium, London, 1980.
27. MAXSON, E.D.; ROONEY, L.W.; LEWIS, R.W.; CLARK, L.E.; JOHNSON, J.W. - The relationship between tanning content, enzyme inhibition, rat performance, and characteristics of sorghum grain. Nutrition Reports International, 8(2), 1973.
28. MCGHEE, J.E.; CARR, M.E.; JULIAN, G.S.T. - Continuous bio-conversion of starch to ethanol by calcium-alginate immobilized enzymes and yeasts. Cereal Chemistry, 61 (5): 446-49, 1984.
29. MENEZES, T.J.B. - Saccharification of Cassava for ethyl alcohol production. Process Biochemistry, 13: 24-26, 1978.
30. MENEZES, T.J.B.; LAMO, P.R.; TEIXEIRA, C.F.; PURCHIO, M. - Possibilidades de produção de álcool a partir de sorgo sacarino. I Simpósio sobre Produção de Álcool no Nordeste, ITAL, 1977.
31. MILLER, G.L. - Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry, 31(3): 426, 1959.
32. NEUCERE, N.J. & SUMRELL, G. - Chemical composition of different varieties of grain sorghum. J. Agric. Food Chem., 28: 19-21, 1980.

33. NIELSEN, B.H. & ROSENDAL, P. - Liquefação a baixa temperatura na produção de etanol a partir do amido. Petro & Química, junho, 1981.
34. NOVO Enzyme Information - Batchwise production of crude dextrin or glucose syrup by enzymatic hydrolysis. IB 167GB, outubro, 1977.
35. PARK, Y.K. & PAPINI, R.S. - Produção de xarope de glicose do amilo de mandioca pelo método enzima-enzima. Revista Brasileira de Tecnologia, 1: 13-16, 1970.
36. PARK, Y.K.; BAR, W.H.; PAPINI, R.S. - Relação entre intumescimento, gelatinização e susceptibilidade dos amilos de mandioca e de milho à alfa-amilase bacteriana. Revista Brasileira de Tecnologia, 2: 95-100, 1971
37. POOL, E.L. & UNDERKOFER, L.A. - Fungal saccharifying agents: amilolytic factors of bran culture and submerged culture. Agricultural and Food Chemistry, 1(1): 87-90, 1953.
38. RADLEY, J.A. - Examination and analysis of starch and starch products. Applied Science Publishers, Ltd, 1976.
39. ROELS, J.A. & TILBURG, R. - Kinetics of reactions with amyloglucosidase and their relevance to industrial applications. Starch/Stärke, 31(10):338-345, 1979.
40. RUGH, S.; NIELSEN, T.; POULSEN, P. - Dextrozyme - A new immobilized glucoamylase - Application Possibilities. 30th Starch Convention, abril, 1979.

41. SADDY, M. & FILHO, A.S. - Modelo cinético para liquefação e sacarificação do amido de mandioca a altas concentrações. PROMON, setembro, 1977.
42. SHIRAISHI, F.; KAWAKAMI, K.; KUSUNOKI, K. - Kinetics of condensation of glucose into maltose and isomaltose in hydrolysis of starch by glucoamylase. Biotechnology and Bioengineering, 27(4): 498-502, 1985.
43. SERRA, G.E. - Algumas considerações sobre as possibilidades de matérias-primas para produção de álcool etílico. Brasil Açucareiro, 3: 260-65, 1976.
44. SKELLAND, A.H.P. - Non-newtonian flow and heat transfer. John Wiley & Sons, 1967.
45. SUBRAMANIAN, V.; JAMBUNATHAN, R.; SURYAPRAKASH, S. - Note on the soluble sugars of sorghum. Cereal Chemistry, 57(6): 440-41, 1980.
46. TEIXEIRA, C.; ANDREASEN, A.A.; KOLACHOV, P. - Ethyl alcohol from Cassava. Industrial and Engineering Chemistry, 42(9): 1781-783, 1950.
47. UEDA, S.; ZENIN, C.T.; MONTEIRO, D.A.; PARK, Y.K. - Production of ethanol from raw Cassava starch by a non-conventional fermentation method. Biotechnology and Bioengineering, 23: 291-99, 1981.
48. UNDERKOFER, L.A.; SEVERSON, G.M.; GOERING, K.J. - Saccharification of grain mashes for alcoholic fermentation. Industrial and Engineering Chemistry, 38 (10): 980-985, 1946.

49. WHISTLER, R.L. & PASCHALL, E.F. - Starch: Chemistry and technology. Academic Press, 1965.