

Enriquecimento do mosto de milho com nutrientes nitrogenados e fosfatados para melhoria da fermentação alcoólica

Enrichment of corn fermentation with nitrogenated and phosphate nutrients for improvement of alcoholic fermentation

DOI:10.34117/bjdv7n3-355

Recebimento dos originais: 08/02/2021

Aceitação para publicação: 15/03/2021

Rafaela Leandra Silva Ferreira

Bacharel em Biotecnologia

IFMT – *Campus* Avançado Lucas do Rio Verde
Av. Universitária, 1600-W, Lucas do Rio Verde - MT
E-mail: rafaelaleandra16@gmail.com

Wanessa Marchy

Técnico em Biotecnologia

IFMT – *Campus* Avançado Lucas do Rio Verde
Av. Universitária, 1600-W, Lucas do Rio Verde - MT
E-mail: wanessamachry@hotmail.com

Manuela Martins

Técnico em Biotecnologia

IFMT – *Campus* Avançado Lucas do Rio Verde
Av. Universitária, 1600-W, Lucas do Rio Verde - MT
E-mail: fmanuela999@gmail.com

Eder Carlos Hoffmann

Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

IFMT – *Campus* Avançado Lucas do Rio Verde
Av. Universitária, 1600-W, Lucas do Rio Verde - MT
E-mail: eder.hoffmann@lrv.ifmt.edu.br

João Vicente Neto

Doutor em Ciência dos Alimentos

IFMT – *Campus* Avançado Lucas do Rio Verde
Av. Universitária, 1600-W, Lucas do Rio Verde - MT
E-mail: joao.neto@ifmt.edu.br

RESUMO

A produção de etanol de milho no Brasil tem chamado a atenção pela velocidade de expansão e pelos volumes de investimentos, haja visto que esta tecnologia de conversão de milho em etanol e outros coprodutos é tecnologia dominante nos EUA e outros países. Diversas pesquisas estão sendo conduzidas para compreensão do metabolismo das leveduras com relação aos processos da produção de etanol, excreção de subprodutos e tolerância das células de leveduras, as quais requerem nutrientes específicos para sobreviver ao estresse osmótico e manter suas funções metabólicas no processo fermentativo. Diante disso, objetivando melhorar a ação das leveduras e melhorar o

rendimento de álcool no processo fermentativo de amido de milho, realizou-se este experimento in vitro, com enriquecimento do amido de milho hidrolisado com nutrientes a base de nitrogênio e fósforo. Os resultados demonstraram uma maior efetividade no tratamento que utilizou-se o fornecimento de nutrientes, com rendimento superior de etanol (13.28%) em relação ao tratamento controle. O enriquecimento do mosto de milho para fermentação alcoólica demonstra viabilidade, com incrementos significativos de rendimento da produção.

Palavras Chave: Bioetanol, biomassa, hidrólise de milho, fermentação, levedura.

ABSTRACT

The Brazilian production of corn ethanol has attracted attention due to speed of expansion and volum of investments, given this technology for converting corn into ethanol and other co-products is dominant technology in USA and other countries. Several researches has being conducted to understand yeast metabolism in relation to ethanol production processes, excretion of by-products and tolerance of yeast cells, which require specific nutrients to survive osmotic stress and maintain their metabolic functions in the fermentation process. Therefore, aiming to improve the action of yeasts and improve alcohol yield in fermentation process of corn starch, this experiment was carried out in vitro, by enrichment of hydrolyzed corn starch with nutrients based on nitrogen and phosphorus. The results demonstrated a greater effectiveness in treatment that used these supplies of nutrients, with higher ethanol yield (13.28%) in relation to the control treatment. The enrichment of corn for alcoholic fermentation has demonstrated viability, with significant increases in ethanol production.

Keywords: bioethanol, biomass, corn hydrolysis, fermentation, yeast.

1 INTRODUÇÃO

O milho é um cereal que mundialmente possui diversas finalidades de emprego, englobando o grão como alimento humano e animal, para a produção de óleo, etanol, farelo e fubá (BREXÓ & SANT'ANA, 2017; ABDULSATTAR et al., 2020; RIBEIRO et al., 2020). Nas últimas décadas tem se destacado como importante biomassa para produção de álcool. Neste contexto, atualmente o etanol feito de cana-de-açúcar e milho representa 82% do mercado mundial de biocombustíveis, onde Brasil e EUA aparecem como os maiores produtores, e juntos, são responsáveis por 90% do mercado mundial de etanol (SCHNEIDER et al., 2018).

A produção de álcool no Brasil é destacada pelo uso de cana de açúcar, porém, nos últimos anos o uso do milho como biomassa de produção de etanol tem se fortalecido no Brasil, principalmente na região centro oeste, haja visto que este cereal, é mundialmente dominante para produção de biocombustível, onde cerca de 15% da produção do grão no mundo, é utilizado para elaboração de etanol (LOZANO et al., 2020).

Os EUA destinam aproximadamente 43% do total da sua produção de milho para etanol e o Brasil 20%, representando 4,63% de todo o etanol produzido no país, onde os principais produtores são os estados de Mato Grosso, Goiás e Paraná (CONAB, 2019). Além de altas taxas de produção, a qualidade do milho (teores de amido) para a produção de etanol, também é importante para a indústria, pois implicam em maiores ou menores rendimento de etanol, além disso, as usinas de produção de etanol a partir do milho se modernizam, em diversos aspectos, incluindo mudanças na destilação, aprimoramento no uso de enzimas hidrolíticas (amilases e glucoamilases), assim como nas tecnologias de fermentações visando aumentar o rendimento em etanol (SCHNEIDER et al., 2018; GARNICA et al., 2019; LOZANO et al., 2020).

A tecnologia de produção do etanol de milho é bastante simples, envolvendo as etapas moagem e cozimento do grão em água, para em seguida sofrerem hidrólise enzimática e posterior fermentação com leveduras, transformando o amido em etanol (BREXÓ & SANT'ANA, 2017). Diferentemente da produção de álcool a partir da cana de açúcar, o fermento (leveduras) não pode ser separado do vinho devido à natureza física do mosto de milho, mais denso e com material sólido em suspensão, assim, após o término da fermentação, todo o conteúdo da dorna é destilado, passando pelas etapas de destilação, retificação e desidratação, e o mosto seco fermentado pode ser utilizado em rações animais por ser um material altamente proteico (MOREIRA & ARANTES, 2018).

Dentre as etapas da produção de etanol de milho, o processo fermentativo tem tomado escopo nas diversas pesquisas para melhor eficiência no rendimento, desde a busca por melhores cepas de leveduras, estudos de melhores temperaturas, como também melhores condições nutricionais para o crescimento das leveduras responsáveis pela fermentação (PACHECO et al., 2011; BONASSA et al., 2014; AKTER et al., 2020).

Neste sentido, objetivou-se com este estudo avaliar a melhoria das condições fermentativas para as leveduras, enriquecendo o mosto com nitrogênio amoniacal e sais de fósforo, proporcionando melhor nutrição para o crescimento e viabilidade celular das leveduras, com possibilidades no aumento do rendimento de etanol.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL EXPERIMENTAL

As amostras de milho destinado a elaboração de etanol foram adquiridas de armazéns no mercado local do município de Lucas do Rio Verde, Longitude 55° 54' 40" W; Latitude 13° 03' 01" S; Altitude 390 m; e precipitação média anual de 1869 mm, provenientes da safra 2019/2020 de variedades denominadas milho Bt. Após adquiridas, as amostras foram armazenadas em balde de polipropileno de média densidade, capacidade 20 LT e encaminhadas ao laboratório de Biotecnologia de Alimentos do IFMT – *Campus Avançado Lucas do Rio Verde* para posterior utilização nos tratamentos experimentais.

2.2 DELINEAMENTO E MODELO EXPERIMENTAL

O experimento foi conduzido em um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC) com 2 (dois) tratamentos: TRAT1 - Mosto de milho sem enriquecimento e TRAT2 – Mosto de milho enriquecido, com 10 (dez) repetições, totalizando 20 (vinte) parcelas experimentais. Cada parcela experimental correspondeu a 250 gramas de mosto.

O modelo experimental utilizado foi:

$$Y_j = \mu + T_j + e$$

Onde:

μ = a média geral do experimento;

T_j = o efeito do tratamento j (não enriquecido, enriquecido);

e = erro experimental associado à observação Y_j , que por suposição é normalmente independente distribuída, com média 0 e variância δ^2 .

2.3 MOAGEM E HIDRÓLISE DO MOSTO DE MILHO

O milho em grão adquirido e armazenado no laboratório de Biotecnologia de Alimentos do IFMT – *Campus* Avançado Lucas do Rio Verde, foi triturado em multiprocessador (Robot Coupe R2, Borgona/França), até obtenção de uma farinha fina tipo fubá com espessura média. Após moagem foi pesado 50 gramas \pm 10 de fubá e misturado 140 mL de água a $90\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, ajustado o pH para $5,2 \pm 0,2$, adicionado 0,8 gramas/kg da enzima α -amilase, para auxiliar a solubilização no líquido foram colocadas em agitador orbital tipo Shaker (Lucadema Científica, LUCA 222, São José do Rio Preto/Brasil), em temperatura de $70\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ com rotação de 150 rpm, tempo de 3 horas para a hidrólise do amido.

Em paralelo foi preparada a propagação e ativação da levedura *Sacharomyces cerevisiae* (Innova[®] yeasts, Novozymes, Bagsvaerd/Dinamarca), em baixa quantidade de glicose 16 °Brix, com presença de oxigênio e temperatura de $32\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH ajustado para $4,8 \pm 0,2$, colocado em Incubadora tipo B.O.D (Lucadema Científica, L110, São José do Rio Preto/Brasil) até completa fermentação dos açúcares. O preparo para ambos os tratamentos nestas etapas foram idênticos.

2.4 FERMENTAÇÃO DO MOSTO DE MILHO

O preparo para a fermentação convencional, para o tratamento controle (TRAT1), foi a mistura do fubá hidrolisado, resfriado a $32^{\circ} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, 0,8 gramas da enzima glucoamilase, com o pH em 4,8 e adição de 10 mL da levedura ativada.

O tratamento em estudo (TRAT2) se difere na suplementação com 1,0 grama de extrato de lúpulo, 1,0 grama de protease (Novozymes, Bagsvaerd/Dinamarca), 2,0 gramas de ureia de uréia agrícola com 46% de N (Petrobrás, Rio de Janeiro/Brasil), e 1,0 grama de superfosfato simples com 17% de fósforo - P_2O_5 (Heringer, Rondonópolis/MT, Brasil), e toda mistura do fubá hidrolisado, resfriado a $32^{\circ} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, 0,8 gramas da enzima glucoamilase, com o pH em 4,8 e adição de 10 mL da levedura ativada.

Os dois tratamentos foram posteriormente colocado em agitador orbital tipo Shaker (Lucadema Científica, LUCA 222, São José do Rio Preto/Brasil) em temperatura de $31\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ com rotação de 150 rpm por 55 horas, até a completa fermentação em anaerobiose.

2.5 ANÁLISES QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS

Foram realizadas as análises de etanol (%), maltose (%), ácido láctico (%), total de açúcares residuais (%) e glicose (%) em cromatografia líquida de ultra alta eficiência – UHPLC (UltiMate 3000 – UHPLC Focused, Thermofisher, USA), segundo metodologia

de CHEN & PETERSON (1994) e YANG et al., (2007), analisado-se uma amostra homogênea ao finalizar as 55 horas de fermentação.

As análises microbiológicas realizadas foram a de células viáveis de levedura em câmara de neubaer conforme metodologia proposta por Lima (1985), e os resultados apresentados em % (porcentagem) de células de leveduras viáveis.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados obtidos para as análises de teor de etanol, maltose, ácido láctico, glicose e células viáveis de leveduras foram analisados no software estatístico R (R Core Team, 2020), aplicando-se a análise de variância (ANOVA) pelo teste F a 5% de significância.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 são apresentados as médias para etanol, glicose, maltose, ácido láctico, total de açúcares residuais e células viáveis de *Sacharomyces cerevisiae* encontradas nos tratamentos de produção de etanol de milho com e sem enriquecimento do mosto.

Tabela 1. Médias para etanol, glicose, maltose, ácido láctico, total de açúcares residuais e células viáveis de *Sacharomyces cerevisiae* encontradas nos tratamentos de produção de etanol de milho com ou sem enriquecimento do mosto. Lucas do Rio Verde – MT, fevereiro 2021.

Teores	Tratamento		P Value	SME
	Não Enriquecido TRAT 1	Enriquecido TRAT 2		
Etanol(%)	11.41 ^b	13.23 ^a	<0,05	0.0252
Maltose(%)	0.24 ^a	0.05 ^b	<0.05	0.0006
Glicose(%)	0.39 ^a	0.31 ^b	<0.05	0.0019
Ácido láctico(%)	0.06 ^a	0.03 ^b	<0.05	0.0003
Total de açúcares residuais (%)	0,95 ^a	0,60 ^b	<0.05	0.0258
Células viáveis(%)	71,43 ^b	77,94 ^a	<0.05	0.1766

^{ab}Médias seguidas de mesma letra entre colunas não diferem entre si pelo teste F a 5% de significância.

Observou-se diferença ($P < 0.05$) nos valores de etanol entre os tratamentos estudados, que foram superiores no tratamento com enriquecimento (13.23%) em relação ao tratamento não enriquecido (11.41%). Considerando essa diferença nos valores obtidos, pode se inferir que valores superiores de etanol estão associados a uma melhor fermentação quando se fornece suprimentos de nitrogênio e fósforo no mosto às leveduras fermentativas.

No caminho metabólico da fermentação alcoólica, em primeiro lugar, a sacarose é convertida em glicose e frutose na reação de hidrólise catalisada pela enzima invertase, consequentemente, glicose e frutose são convertidos em piruvato e cada molécula de

piruvato é convertida a acetaldeído em uma reação de descarboxilação através da ação da enzima piruvato descarboxilase que gera uma molécula de CO_2 , esse acetaldeído é reduzido a etanol a partir da enzima álcool desidrogenase, assim mecanismos que possam potencializar esse processo fermentativo devem ser estudados (RODRIGUES et al., 2018).

Houve diferença ($P < 0.05$) entre os tratamentos para o total de açúcares residuais, onde a suplementação atendeu as expectativas de produção alcoólica, com rendimento superior em etanol no TRAT2 (13.23%), demonstrando que os suprimentos nutricionais auxiliaram as levedura, logo converteu o açúcar disponível em uma quantidade maior de etanol, quando comparada a fermentação sem enriquecimento TRAT1 (11.41%). Considerando os teores observados para os açúcares residuais entres os tratamentos, evidenciou-se uma baixa conversão, esse fato impacta na produção de etanol, o maior consumo de açúcares se deu no TRAT2 (0,60%), justificando-se assim superior valores de etanol ao fim da fermentação.

A adição de nutrientes em processos fermentativos, afetam os parâmetros cinéticos que definem as taxas de reprodução celular, o fósforo é essencial para o metabolismo energético e na síntese de ácidos nucléicos, sua função esta na participação da produção de ATP, tanto na cadeia respiratória quanto na conversão de açúcar em álcool, todas estas suplementações estimulam uma melhora nas células para obter ganho de produção e suportar as condições do meio (PEREIRA, 2007; RIBEIRO et al., 2020), já o uso de protease durante a fermentação disponibiliza certos aminoácidos do próprio milho para a levedura usar como complementação nutricional celular (SANTOS, 2008).

O uso de uréia como fonte de nitrogênio, ajuda no processo de intensificação de rota metabólica para etanol, já que sem este a levedura procura retirar nitrogênio de aminoácidos o que acarreta levando a produção de álcoois superiores que não é de interesse, em vez de produzir etanol, que associado ao uso de extrato de lúpulo, que atua como antioxidante e antimicrobiano protegendo de processos oxidativos e de contaminações microbiológicas por outros microrganismos, como as bactérias (DURELLO, SILVA, BOGUSZ, 2019).

Houve diferença ($P < 0.05$) entre os tratamentos, para os teores de ácido láctico, sendo inferior no TRAT2 (0,03%). Os baixos níveis de ácido lático indicam um ambiente fermentativo sem contaminação por bactérias, onde poderiam competir no meio para consumir a glicose, e influenciar a produção de etanol, o que foi potencializado no tratamento que foi siplementado com nitrogênio e fósforo, demonstrando melhor capacidade de desenvolvimento da levedura. Em processos de fermentação alcólica teores

elevados de ácido láctico demonstram contaminação por bactérias, que além de produzirem este ácido, diminuem a capacidade de transformação de açúcar em álcool pelas leveduras e conseqüente menor rendimento em etanol (RODRIGUES et al., 2018). Da mesma maneira, elevados teores de ácido láctico interferem no pH do mosto e podem interferir na faixa adequada deste índice para o crescimento das leveduras *Sacharomyces cerevisiae*, que é entre 4 a 5 (BREXÓ & SANT'ANA, 2017; ABDULSATTAR et al., 2020).

Houve diferença ($P < 0.05$) entre os tratamentos para a viabilidade celular. Foram observados valores superiores para este teor no TRAT2 (77,94%), indicando que os nutrientes adicionados ao mosto contribuíram para um melhor crescimento da levedura e uma maior viabilidade de células. Os nutrientes adicionados ao mosto no processo de fermentação alcólica podem contribuir para a viabilidade celular das leveduras, refletindo no ganho de sua vida útil e por não precisar de elevados gastos energéticos de ATP, podendo desta maneira realizar a conversão de açúcar em etanol (BONASSA et al., 2014; AKTER et al., 2020).

4 CONCLUSÃO

As adições de suplementos nutricionais a base de nitrogênio e fósforo melhoram as condições de fermentação alcólica de milho, propiciando melhores condições para o metabolismo da levedura, com aumento de rendimento em etanol, quando comparado a um processo de fermentação sem suplementação nutricional.

REFERÊNCIAS

- ABDULSATTAR, M. O.; ABDULSATTAR, J. O.; GREENWAY, G. M.; WELHAM, K. J.; ZEIN, S. H. Optimization of pH as a strategy to improve enzymatic saccharification of wheat straw for enhancing bioethanol production. **Jornal of Analytical Science and Technology**, 11-17, 2020.
- AKTER, S.; ZABED, H. M.; SAHU, J. N.; CHOWDHURY, F. I.; FARUQ, G.; BOYCE, A. N.; QI, X. Bioethanol production from water-soluble and structural carbohydrates of normal and high sugary corn stovers harvested at three growth stages. **Energy Conversion and Management**, 221, 1-15, 2020.
- ATALA, D. I. P. Montagem, instrumentação, controle e desenvolvimento experimental de um processo fermentativo extrativo de produção de etanol / Daniel Ibraim Pires Atala. – Campinas, SP: [s.n.], 2004.
- BONASSA, G.; SCHNEIDER, L. T.; CREMONEZ, P. A.; OLIVEIRA, C. de J. De; TELEKEN, J. G.; FRIGO, E. P. Optimization of first generation alcoholic fermentation process with *Saccharomyces cerevisiae*. **Acta Scientiarum Technology**, Maringá, v.37, n.3, 313-320, 2015.
- BREXÓ, R. P.; SANT'ANA, A. S. Reviews, **Renewable and Sustainable Energy**, 73, 423–434, 2017.
- CHEN, H-M.; PETERSON, C. M. Quantifying ethanol by high performance liquid chromatography with precolumn enzymatic conversion and derivatization with fluorimetric detection. **Alcohol**, volume 11, Issue 6, 577-582, 1994.
- CHERUBIN, Rudimar Antonio. Efeitos da viabilidade da levedura e da contaminação bacteriana na fermentação alcoólica. Piracicaba, 2003.
- CONAB. **Companhia Nacional de Abastecimento**, disponível <https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/3342-pais-confirma-recorde-historico-na-producao-de-etanol-35-6-bilhoes-de-litros-na-safra-2019-20>, acesso em 03/02/2021.
- Cruz, Mariana Lopes. Avaliação de condições operacionais na fermentação alcoólica VHG empregando diferentes cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, 2019.
- DURELLO, Renato S., Silva, Lucas M., & Bogusz Jr., Stanislau. (2019). QUÍMICA DO LÚPULO. *Química Nova*, 42(8), 900-919. Epub October 21, 2019.
- EVANGELISTA, A.F. et al. Produção e estudo do potencial de hidrólise de uma nova fonte de enzimas amilolíticas a partir do malte de milho (*Zea mays*). *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, v.17, n.1, p.1-14, 2005.
- F. PEREIRA¹, P. H. A. SILVA², P. F. PINHEIRO³, L. M. BRAGA¹, C. A. PINHEIRO³. ADIÇÃO DE FONTES DE NITROGÊNIO E DE DUAS LINHAGENS DE LEVEDURA

NA FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA PARA PRODUÇÃO DE CACHAÇA. Revista de Engenharia Química e Química Vol. 01 N. 01 (2015) 045–059.

FARIAS, Daniele; MARGARITES, Ana Cládia; REINEHR, Christian Oliveira; COLLA, Luciane Maria; COSTA, Jorge Alberto Vieira; BERTOLIN, Telma Elita. Potencial amilolítico do grão de milho maltado no processo de sacarificação do mesmo cereal. Ciênc. agrotec. vol.33 no.3 Lavras May/June 2009.

GARNICA, A. I.C.; PAZ, J. E. M.; CURBELO, F. D. S. Redimensionamento do sistema de resfriamento da fermentação para elevação da capacidade de produção de etanol. **HOLOS**, Ano 35, v.4, e8374, 2019.

Ilha, Eunice; Cassanego; Bertoldi, Fabiano Cleber; Reis, Vanderlei Doniseti Acássio dos; Sant'Anna, Ernani. Rendimento e eficiência da fermentação alcoólica na produção de hidromel – Corumbá: **Embrapa Pantanal**, 2008.

JAN FIEDUREK, MARCIN SKOWRONEK and ANNA GROMADA. Selection and Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to Increased Ethanol Tolerance and Production. **Polish Journal of Microbiology**, Vol. 60, N.1, 51-58, 2011.

JONES, A. M.; INGLEDEW, W. M. Fuel alcohol production: Optimization of temperature for efficient very-high-gravity fermentation. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 3, p. 1048-1051, 1994.

LIMA, A. O. Métodos de laboratório aplicados a clínica: técnica de interpretação. Rio de Janeiro : **Guanabara Koogan**, 188p., 1985

LOZANO, E. do v.; NOGUEIRA, L. C.; ALCANTARA, G. U.; COSTA, G. H. G. Híbridos de Milho Afetam a Quantidade de Etanol Produzida no Cerrado do Centro-Oeste Paulista. **Journal of Social, Technological and Environmental Science**, v.9, n.1, 424-438, 2020.

M. L. CRUZ; F.T.M. SILVA; M. L. F. RAMINHO; A. L. M. CASTRO¹; M. M. RESENDE E. J. RIBEIRO. ESTUDO DA VIABILIDADE DA LEVEDURA *Saccharomyces cerevisiae* Y904 EMPREGANDO PROCESSO FERMENTATIVO EM BATELADA REPETIDA. **COBEQ**- Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2014.

MANZOLLI, Eduardo Scandinari. Produção de cerveja utilizando laranja como malte. Ed. Reimp, Lorena, 2016.

MEDEIROS, S. S. FERMENTAÇÃO ALCOÓLICA EMPREGANDO ALTAS CONCENTRAÇÕES DE AÇÚCARES. UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA-GO, 2019.

MENDES, T. A. O. et al. Aumento na produção de biomassa de levedura em propagador aerado por processo descontínuo e semicontínuo para produção de cachaça. **Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 16, n. 2, p. 81-89, abr./jun. 2013.

MOREIRA, M. M. R.; ARANTES, S. M. Análise socioeconômica e ambiental da produção de etanol de milho no centro oeste brasileiro. **INPUT**, São Paulo, maio de 2018.

NOBRE, Thais de Paula; HORII Jorge; ALCARDE, André Ricardo. Viabilidade celular de *Saccharomyces cerevisiae* cultivada em associação com bactérias contaminantes da fermentação alcoólica. *ciênc. Tecnol. Aliment.* vol.27 no.1 Campinas Jan./Mar. 2007.

PACHECO, T. F.; Produção de Etanol: Primeira ou Segunda Geração?. **EMBRAPA, Circular Técnica**, Brasília, n.4, 6p., 2011.

PEREIRA, A. F. Suplementação de nitrogênio sobre a fermentação alcoólica para produção de cachaça, cerveja e vinho. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Viçosa-MG, 2007.

R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RIBEIRO, L. C. P.; COELHO, M. A. Z.; FERREIRA, T. F. Butanol production by *Clostridium pasteurianum* NRRL-598 using corn steep liquor as nutrient source, **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, v.6, n.7, 45399-45404, 2020.

RODRIGUES, K. C. S., SONEGO, J. L. S., CRUZ, A. J. G., BERNARDO, A., & BALDINO, A. C. (2018). Modeling and simulation of continuous extractive fermentation with CO₂ stripping for bioethanol production. **Chemical Engineering Research and Design**, 132, 77-88.

SANTOS, A. M. dos. Estudo da influência da complementação de nutrientes no mosto sobre o processo de fermentação alcoólica em batelada. Maceió, 2008.

SCHNEIDER, R. C. S.; C. S.; JUNIOR, C. S.; FORNASIER, F.; SOUZA, D.; CORBELLINI, V. A. Bioethanol production from broken rice grains. **INTERCIENCIA**, vol. 43 n.12, 846-851, 2018.

SILVA, Franciele Maria Borges da; NASCIMENTO, Carla Oliveira. ANÁLISE DE VIABILIDADE DA PRODUÇÃO DE ETANOL DERIVADO DO MILHO: UM ESTUDO COMPARATIVO. Universidade de Rio Verde-GO.

STECKELBERG, C. Caracterização de leveduras de processos de fermentação alcoólica utilizando atributos de composição celular e características cinéticas I Cláudia Steckelberg. **Campinas, SP**: [s.n.], 2001.

YAMAKAWA, Celina Kiyomi; LEAL, Jairo Silvestre Moura; CARLOS, Jonas Nolasco Junior; ROSELL, Eduardo Vaz. Processos de Fermentação Alcoólica com Reciclo de Células. **Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais Laboratório Nacional de Ciência e Tecnologia do Bioetanol**, 2016.

YANG, J.; LEE, P. J.; DI GIOIA, A. J de. Fast HPLC analysis for fermentation ethanol processes. **Aplicvation Notes Waters Corporation**, Milford/USA, 4p, June 2007.