

COMUNICADO
TÉCNICO

246

Sete Lagoas, MG
Novembro, 2020

Embrapa

Metodologia científica: determinação do rendimento de produção de etanol de grãos de milho por via seca em escala laboratorial

Wilton Soares Cardoso
Maria Cristina Dias Paes
Sandy Rodrigues Dias
Júlio Dias Camporezi
Mariana Uliana Modolo
Flávia de Abreu Pinheiro

Metodologia científica: determinação do rendimento de produção de etanol de grãos de milho por via seca em escala laboratorial

Wilton Soares Cardoso, Eng. de Alimentos, DSc em Bioquímica Agrícola, Prof. do Instituto Federal do Espírito Santo *campus* Venda Nova do Imigrante; Maria Cristina Dias Paes, Nutricionista, Ph.D em Ciências de Alimentos e Nutrição Humana, Analista da Embrapa Milho e Sorgo; Sandy Rodrigues Dias, Discente do curso de Bacharelado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal do Espírito Santo *campus* Venda Nova do Imigrante; Júlio Dias Camporezi, Discente do curso de Bacharelado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal do Espírito Santo *campus* Venda Nova do Imigrante; Mariana Uliana Modolo, Discente do Curso de Bacharelado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto Federal do Espírito Santo *campus* Venda Nova do Imigrante; Flávia de Abreu Pinheiro, Eng. de Alimentos, DSc em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Prof. do Instituto Federal do Espírito Santo *campus* Venda Nova do Imigrante.

Introdução

Na produção de etanol de milho a variabilidade na qualidade da matéria prima pode gerar, em média, uma perda de 3 a 23% no etanol produzido (Singh, 2012), sendo necessárias análises que permitam selecionar genótipos de milho desenvolvidos a cada ano, e assim promover para os agricultores e as indústrias os melhores materiais em rendimento de etanol.

A produção de etanol de milho possui dois processos principais: via seca e via úmida, cada um com diferentes adaptações e/ou modificações (Kurambhatti et al., 2019). No processo via úmida (*wet-milling*) ocorre a separação das diferentes frações anatômicas do grão de milho, favorecendo a obtenção de diversos produtos de valor agregado, dentre eles, amido, proteína, fibra, gás carbônico (CO₂) e óleo (Bothast; Schlicher, 2005). O processo de moagem a seco (via seca ou *dry-milling*) produz etanol,

óleo de milho, CO₂ e o resíduo chamado DDGS (*dried distillers' grains with solubles* - grãos secos de destilaria com solúveis), sendo o processo mais usado, em razão dos custos iniciais mais baixos (Mousdale, 2010).

Para produção de etanol no processo via seca, o grão de milho moído é adicionado de água e enzimas para promover a hidrólise do amido a açúcares fermentescíveis. A hidrólise enzimática acontece pelo desdobramento total das moléculas de amilose e amilopectina, com rompimento das ligações glicosídicas (α -1,4 e α -1,6), transformando-se em dextrinas cada vez mais simples, oligossacarídeos, maltose e, finalmente, glicose. Do resíduo final da destilação tem-se o etanol separado do DDGS (Mousdale, 2010). Em média, 25 kg (1 bushel) de milho produz cerca de 10,2 litros (2,7 galões) de etanol e 7,71 kg (17 libras) de grãos destilados secos com solúveis (DDGS) (United States Department Agriculture, 2019).

O DDGS é o principal coproduto do processo via seca, contém uma fração de amido não fermentado, mas também contém óleo, proteínas, leveduras, bem como carboidratos não hidrolisados e não fermentados, como celulose e hemicelulose (Bothast; Schlicher, 2005). O DDGS é comercializado como suplemento proteico destinado à alimentação animal (Brito, 2008; Mousdale, 2010).

Durante o processo via seca, a hidrólise enzimática é realizada em duas etapas: liquefação e sacarificação. No processo de liquefação, os grânulos de amido são dispersos em solução aquosa e aquecidos causando a gelatinização (gomificação) e, com adição da α -amilase, ocorre a quebra das ligações α -1,4 resultando em hidrolisados parciais (maltodextrinas e maltose) irreversivelmente (Maarel et al., 2002). Em seguida, a solução de maltodextrina/maltose resultante é hidrolisada por enzima desramificante, seja endoenzima (isoamilase e pululanase) ou exoenzima (β -amilase e amiloglicosidase), atuando sobre as ligações glicosídicas α -1,6 da amilopectina e, ou α -1,4 das extermidas não redutoras, sendo o resultado dessa segunda etapa uma solução de glicose (Maarel et al., 2002).

Com o açúcar disponível, o passo final na produção de etanol é a fermentação, em que um mol de glicose produz 2 mols de etanol e 2 mols de gás carbônico (Darwin et al., 2018; Harden; Young, 1908), conforme reação abaixo:



Para que ocorra a fermentação, utiliza-se a adição de leveduras, sendo a mais comum a *Saccharomyces cerevisiae* (Amorim et al., 2009). O rendimento de conversão de glicose em etanol por esta levedura é cerca de 90 a 92% (Lima et al., 2001; Amorim et al., 2011).

No processamento de grãos de milho a etanol, utiliza-se mais frequentemente o processo de sacarificação e fermentação simultâneo (SSF), com adição das enzimas e as leveduras juntas, realizado como um único passo, reduzindo o tempo total (Pinaki et al., 2015).

Neste caso, a SSF é realizada com temperatura mais baixa (32-35 °C) que o processo de sacarificação isolado, permitindo assim que uma enzima específica seja capaz de produzir glicose. Como a glicose é formada e fermentada simultaneamente, isso reduz a inibição da enzima pelo produto. Outras vantagens da SSF é que com baixa concentração de glicose, no início do processo, há menor risco de contaminação e requer menor gasto de energia para produção de etanol (Cardona; Sánchez, 2007).

A metodologia descrita nesta publicação foi desenvolvida para determinar o rendimento de produção de etanol em amostras de grãos de milho em condições de bancada, através do processo via seca, por meio de sacarificação e fermentação simultâneas (SSF), permitindo diferenciar genótipos quanto à qualidade para produção de etanol. O processo representa o mais frequentemente utilizado nas usinas de etanol de milho em funcionamento no Brasil.

Materiais

- Airlocks (Sterilock)
- Balões de borosilicato de fundo chato 50 e 100 mL
- Balão volumétrico de borosilicato de 1000 mL
- Bastão de vidro
- Béqueres de vidro de 50 e 100 mL
- Dessecador de vidro 300 mm com dessecante sílica-gel
- Espátula de aço inoxidável
- Filme de PVC
- Filme de vedação para uso em laboratório (Parafilm M)
- Funis de Buchner de porcelana
- Kitassatos de vidro de 250 mL
- Papel de filtro qualitativo 80g diâmetro de 11 cm
- Picnômetro
- Pinça de aço inoxidável
- Pipeta automática de 10 µL
- Pipeta automática de 1000 µL
- Pisseta
- Ponteiras para pipeta automática de 10 µL
- Ponteiras para pipeta automática de 1000 µL
- Provetas de 50 mL
- Rolhas de silicone para balões de 50 e 100 mL com orifício para airlock

- Suporte para tubo de ensaio
- Tubos de ensaio de vidro de 20 mL
- Tubos tipo falcon de 50 mL
- Tubos de Kjeldahl

Reagentes

- Acetato de sódio anidro PA
- Ácido acético PA
- Ácido clorídrico PA
- Liquozyme® Supra 2.2X
(Novozymes)
- Spirizyme Fuel Ultra XHS
(Novozymes)
- Ureia PA
- Tiosulfato de neomicina
(Sigma-Aldrich)
- Leveduras liofilizadas (Fermento biológico seco instantâneo, marca Fleischmann)

Equipamentos

- Balança analítica
- Banho-maria com agitação
- Chapa aquecedora
- Capela de exaustão de gases
- Destilador Kjeldahl
- Estufa de circulação de ar
- Incubadora com agitação orbital
- Moinho de facas
- Bomba de vácuo

Equipamentos de segurança

- Calçado fechado
- Jaleco
- Luvas de látex
- Óculos de segurança

Preparo de soluções

Tampão Acetato 100 mmol L⁻¹ pH 5,0

Transferir 5,25 g de acetato de sódio anidro para um balão volumétrico de 1000 mL e adicionar 2,06 mL de ácido acético. Adicionar 900 mL de água deionizada e dissolver completamente. Ajustar o pH 5,0 com ácido clorídrico 100 mmol L⁻¹, se necessário. Completar o volume e homogeneizar. Transferir para um frasco de vidro próprio para reagentes e identificar a solução. Estocar em temperatura ambiente por no máximo 30 dias.

Solução de ureia 50% (m/v)

Pesar 5,0 g de ureia em um béquer de 50 mL e adicionar 7 mL água deionizada. Após a dissolução, transferir a solução para um balão volumétrico de 10 mL e completar com água deionizada. Homogeneizar e transferir a solução para um frasco de vidro próprio para reagentes e identificar a solução. Armazenar sob refrigeração por no máximo 30 dias.

Preparo da amostra

Moer as amostras de grãos de milho em granulometria fina de 0,5 mm em moinho de facas ou de martelo, imediatamente antes de iniciar o procedimento. Caso as análises não sejam realizadas no dia, manter as amostras moídas sob refrigeração até o dia seguinte, ou em freezer (-18°C), caso o prazo seja maior do que 24 horas. A umidade da amostra antes da análise deve ser conhecida. Para obtê-la, utilizar metodologia do Adolf Lutz (Zenebon et al., 2008).

Preparo e adição das enzimas

A enzima Liquozyme® Supra 2.2X (Novozymes) hidroliza o amido a dextrinas agindo nas ligações (1,4)- α -D-glicosídeo, reduzindo a viscosidade da solução, e assim preparando-a para processamento na etapa seguinte. A temperatura ideal de ação dessa enzima é 90 °C, sendo a atividade enzimática de 240 KNU g⁻¹ de enzima [KNU = unidades de *Kilo Novo (Kilo Novo Units)* de α -amilase, sendo uma KNU a quantidade de α -amilase, que sob condições padrões (pH 7,1 a 37 °C), dextriniza 5,26 g de amido por hora. A enzima comercial é apresentada na forma líquida, com cor marrom escura e densidade de aproximadamente 1,26 g mL⁻¹.

A Spirizyme Fuel Ultra XHS (Novozymes) é uma glucoamilase que hidrolisa as ligações α -1,6 da amilopectina e α -1,4 nas extremidades não

reduzidoras do amido liquefeito. Possui como condições ótimas pH próximo a 4,5 e temperatura em torno de 65 °C. A Spirizyme comercial (densidade 1,15 g mL⁻¹) tem atividade de 750 AGU g⁻¹, sendo AGU a quantidade de enzima que hidrolisa 1 μmol de maltose por min, sob condições específicas.

A definição da quantidade de enzima adicionada neste protocolo para liquefação e sacarificação do amido de milho foi determinada, tendo como referência as condições de produção de etanol propostas por Ramchandran et al. (2015). Assim, para hidrólise do amido de milho, utilizar 6 μL de Liquozyme e 10 μL de Spirizyme para 30 mL de mosto com 25% (m/v) de milho moído.

Preparo das leveduras

Pesar 1 g de levedura comercial (*Saccharomyces cerevisiae*) liofilizada (Fleischmann) e transferir para um tubo de ensaio contendo 5 mL de água deionizada. Tampar o tubo, homogeneizar e deixar em agitação a 32 °C por 30 minutos. Preparar as leveduras 30 minutos antes do final da liquefação.

Procedimento

Na Figura 1 é apresentado o fluxograma do processo de produção de etanol via seca a partir de amostras moídas de grãos de milho, seguindo o protocolo descrito nesta publicação.

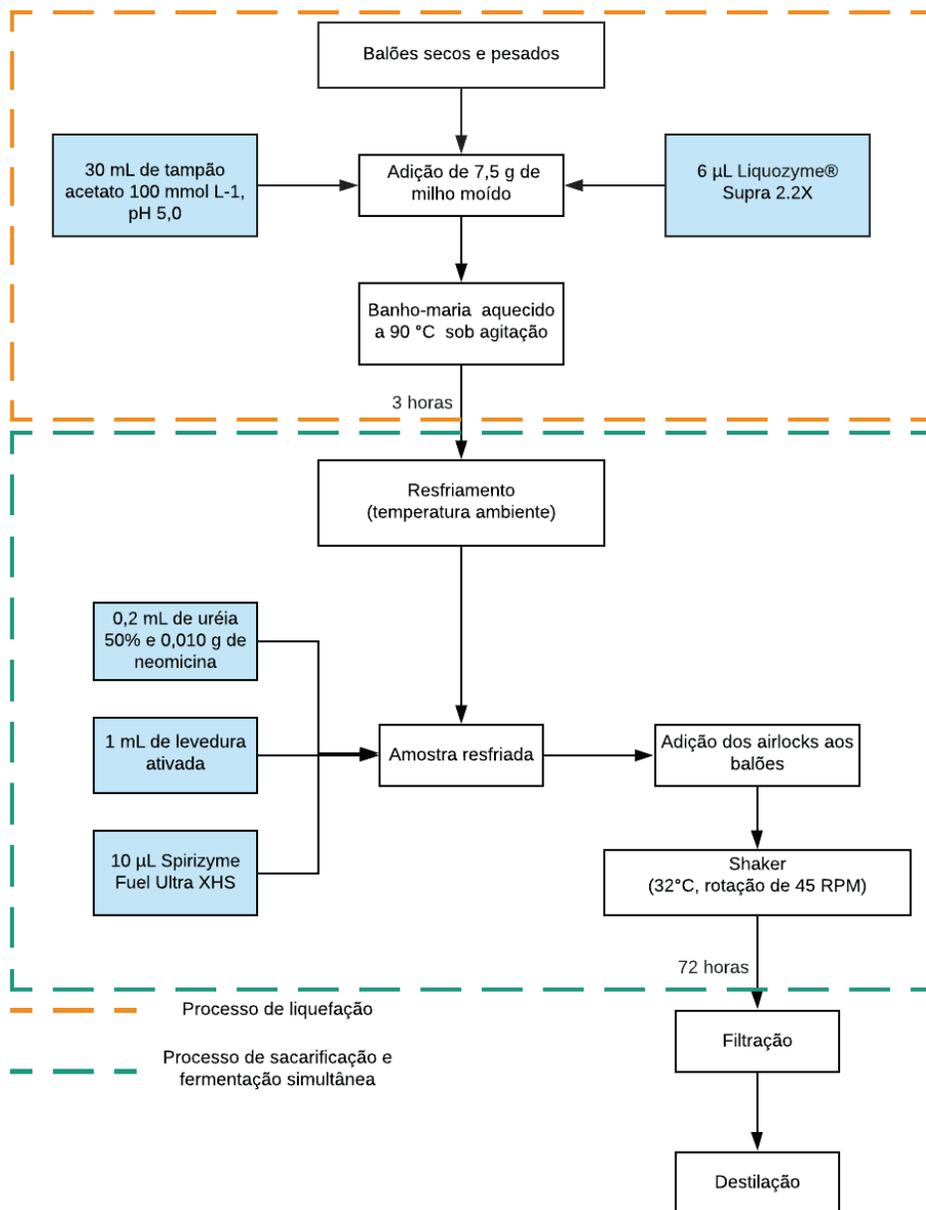


Figura 1. Fluxograma do processo de bancada para obtenção de etanol de milho via sacarificação e fermentação simultânea.

Preparo do mosto

Os balões para o preparo do mosto devem ser secos em estufa a 105 °C por 1 hora e deixados esfriar em dessecador antes do uso.

Identificar e pesar os balões anotando a massa. Adicionar 7,5 g da amostra de milho moída a cada balão. Prender os balões no suporte do banho-maria (Figura 2), em seguida, adicionar 30 mL de tampão acetato 100 mmol L⁻¹ pH 5,0. Preparar três repetições para cada amostra.



Foto: Sandy Dias e Wilton Cardoso.

Figura 2. Suporte do banho-maria com os balões contendo grãos de milho moído sendo preparado para liquefação.

Liquefação

Com o mosto preparado, adicionar 6 µL da enzima α-amilase Liquozyme® Supra 2.2X em cada balão, fechando com uma rolha plástica. Homogeneizar levemente e transferir os balões para um banho-maria em temperatura de 90 °C sob agitação por 3 horas.

Sacarificação e fermentação

Ao final da liquefação, retirar os balões do banho-maria, colocar sobre a bancada em suporte e aguardar atingir temperatura ambiente (cerca de 40 minutos). Adicionar em seguida a cada balão 200 µL de ureia 50% (m/v) e 1000 µL das leveduras ativadas. Em seguida, pesar e adicionar 0,010 g de antibiótico tiosulfato de neomicina (Sigma) e 10 µL da enzima glucoamilase Spirizyme Fuel Ultra XHS. Fechar cada balão com rolha de silicone e encaixar o *airlock*. Passar filme de vedação ao redor da rolha, *airlock* e gargalo do balão para evitar a entrada de ar (Figura 3). A rolha de silicone e o *airlock* garantem a saída do gás carbônico gerado durante a fermentação, sem entrada de oxigênio.



Foto: Sandy Dias e Wilton Cardoso.

Figura 3. Balão com *airlock* preparado para sacarificação e fermentação simultânea.

Com os balões preparados, levá-los para a incubadora shaker por 72 horas a 32 °C, com rotação de 45 RPM para que ocorram sacarificação e fermentação simultâneas (Figura 4).



Foto: Sandy Dias e Wilton Cardoso.

Figura 4. Balões em incubadora shaker para o processo de SSF.

Após 72 horas, o processo de fermentação pode ser interrompido, e as amostras fermentadas (Figura 5) devem seguir para filtração ou destilação (em processos industriais).



Foto: Sandy Dias e Wilton Cardoso.

Figura 5. Amostras de milho fermentado por 72 horas em processo de fermentação e sacarificação simultânea.

Filtração

Filtrar o fermentado no balão em papel de filtro qualitativo 185 mm em funil de Buchner acoplado a kitassato. Conectar a mangueira no kitassato e ligar o vácuo antes de iniciar a filtragem.

Transferir lentamente o fermentado para o filtro com auxílio de bastão de vidro. Manter o vácuo durante o processo de filtração. As partículas sólidas ficarão retidas no filtro (Figura 6) e o líquido será recolhido no kitassato. Adicionar cerca de 5 mL de água deionizada ao balão e verter no filtro para garantir que todo etanol produzido seja recolhido no kitassato. O resíduo retido na filtração irá compor o DDGS.



Foto: Sandy Dias e Wilton Cardoso.

Figura 6. Partículas sólidas retidas no papel filtro após o processo de filtração.

Pesagem dos resíduos

Após o processo de filtração, levar os balões com resíduos aderidos na parede para uma estufa de circulação a 105 °C por 1 hora, deixar esfriar em dessecador por 30 minutos e, em seguida, pesar os balões anotando a massa. Calcular a diferença de massa dos balões com resíduos e sem resíduos (peso do balão antes de colocar a amostra). Essa diferença é parte da amostra de milho (não fermentado) que aderiu à superfície do balão durante o processo. Essa diferença, apesar de pequena, deve ser descontada do peso inicial, para o cálculo do rendimento final de cada amostra.

O filtro com o resíduo deve ser recolhido cuidadosamente, pesado e seco em estufa na temperatura de 60 °C por 12 horas. O resíduo seco (Figura 7) é o DDGS e deve ser armazenado em freezer a -18 °C até a sua destinação.

Foto: Sandy Dias e Wilton Cardoso.



Figura 7. Filtro com resíduos do processo de filtração secos em estufa. Esse resíduo final compõe o DDGS.

Destilação

Nesta etapa, o etanol na amostra é evaporado e depois recuperado por condensação. Para a destilação, utilizar o destilador de nitrogênio na temperatura de 70 °C (Figura 8).



Foto: Sandy Dias e Wilton Cardoso.

Figura 8. Destilador de nitrogênio com tubo contendo a amostra que passou pelo processo de sacarificação e fermentação simultânea. Béquero como banho de gelo para proveta de 50 mL que coletará o etanol condensado.

Transferir o filtrado do kitasato que contém o etanol para uma proveta de 50 mL. Novamente, com um pequeno volume de água deionizada, lavar o kitasato para garantir que todo etanol seja transferido para a proveta. O volume da proveta deve ser completado com água destilada até 50 mL e, em seguida, transferido para o tubo de destilação ou tubo de Kjeldahl.

Encaixar o tubo de destilação no suporte de borracha no destilador, garantindo que o tubo branco, que fornecerá vapor, esteja no interior do tubo. O tubo deve ser encaixado na parte superior por meio da elevação do suporte inferior, garantindo que o tubo fique preso na parte superior e inferior como na Figura 9.



Foto: Sandy Dias e Wilton Cardoso.

Figura 9. Tubo de destilação acoplado ao destilador. Assegurar que este esteja bem firme para evitar acidentes, para isso, deve-se girar o suporte inferior até prender firmemente o tubo ao encaixe superior.

O etanol condensado é recolhido em outra proveta de 50 mL disposta no final do processo (coletor do destilador de Kjeldahl) imersa em banho de gelo para evitar evaporação do etanol condensado (Figura 8). Destilar a amostra até o volume do condensado atingir 37,5 mL na proveta.

Determinação do teor de etanol

O teor de etanol deve ser determinado por densidade relativa seguindo o protocolo descrito pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2013), utilizando um picnômetro.

O picnômetro (limpo e seco) deve ser pesado vazio, depois pesado com água deionizada a 20 °C e, em seguida, o destilado a 20 °C. O controle de temperatura é feito com banho de gelo, em que a temperatura é monitorada constantemente com o auxílio de um termômetro digital.

A densidade relativa do destilado é dada pela equação (1):

$$D = \frac{m_{\text{pic+amostra}} - m_{\text{picvazio}}}{m_{\text{pic+H}_2\text{O}} - m_{\text{picvazio}}} \quad (1)$$

onde:

D = densidade relativa

$m_{\text{pic+amostra}}$ = massa do picnômetro mais amostra (g)

m_{picvazio} = massa do picnômetro vazio e seco (g)

$m_{\text{pic+H}_2\text{O}}$ = massa do picnômetro com água destilada (g)

O teor de etanol do destilado (volume de 37,5 mL) é determinado utilizando a Tabela 1 (Anexo) de porcentagem de álcool em volume a 20 °C (% v/v) correspondente à densidade relativa (Zenebon et al., 2008) da equação (1).

Determinação do rendimento em etanol das amostras

Depois de determinado o teor de etanol do destilado, transformar esta concentração (v/v) em massa (g) de álcool no destilado pela equação (2):

$$m = \frac{t \times v \times d}{100} \quad (2)$$

onde:

m = massa de etanol (g)

t = teor de etanol do destilado (% v/v) encontrado na Tabela 1

v = volume de amostra destilada (valor fixo) = 37,5 mL

d = densidade do etanol a 20 °C = 0,7893g mL⁻¹

Assim, o rendimento de etanol é calculado pela equação (3):

$$R_{bu} = \left(\frac{m}{m_{amostra} - m_{residuo}} \right) \times 100 \quad (3)$$

onde:

R_{bu} = rendimento final de etanol (%) em base úmida

m = massa de etanol (g)

m_{amostra} = massa da amostra (g)

m_{residuo} = massa do resíduo (g)

Utilizar as médias das triplicatas analíticas para avaliação dos resultados. Esse rendimento final é expresso em base úmida (b.u.).

Nesta etapa também se deve fazer a correção dos rendimentos com relação ao teor de umidade da amostra de milho moída, com intuito de diminuir os erros causados por amostras com diferentes teores de umidade.

Assim, o rendimento final será convertido em base seca (b.s.), conforme equação (4):

$$R_{bs} = \left[\frac{R_{bu}}{1 - (u/100)} \right] \quad (4)$$

onde:

R_{bs} = rendimento final de etanol (%) em base seca

R_{bu} = rendimento final de etanol (%) em base úmida

u = teor de água da amostra (%)

Ao final, para obter o resultado em volume de etanol para cada kg de milho, dividir R_{bs} por 78,93 (densidade do etanol a 20 °C X 100), e assim expressar litros de etanol anidro/kg de milho.

Resultados Esperados

Valores de rendimento (m/m) esperados de 20 a 43%, ou 0,2533 a 0,500 L de etanol anidro/kg de milho.

O coeficiente de variação entre as triplicatas para validação da metodologia foi de 6%, sendo aceitável abaixo de 10%.

Para validação do método em relação à exatidão foi considerada a diferença de rendimento de etanol no ensaio versus o rendimento teórico do etanol baseado no teor de amido do grão. O rendimento teórico de etanol de milho foi baseado na concentração conhecida de amido, a produção estequiométrica de 51% de etanol a partir do amido e a eficiência de fermentação do milho que é aproximadamente 81,3% do valor teórico. Assim, foi realizado o teste t Student da diferença entre o valor obtido menos o valor teórico entre as amostras utilizando a seguinte fórmula:

$$t = \frac{\bar{y}_d}{\frac{S_d}{\sqrt{n}}}$$

\bar{y}_d é média das diferenças do valor obtido menos valor teórico;

S_d é o desvio padrão das diferenças do valor obtido menos valor teórico;

n é o número de amostras.

A hipótese de nulidade é a de que a diferença será zero.

O método terá exatidão quando o valor t calculado for menor que t tabelado (bidimensional) para o nível de 1% de significância, como foi verificado nos ensaios de validação do método.

Informações Relevantes

- Utilizar jaleco, luvas e óculos de segurança durante a realização das análises.
- Realizar as determinações de densidade em sala com controle de temperatura igual ou abaixo de 20 °C.
- Manusear os solventes voláteis e soluções ácidas/básicas na capela.
- No momento de pipetar as enzimas, usar sempre ponteiros novas. Preferencialmente, utilizar pipetas automáticas para líquidos viscosos.
- No uso da tabela de densidade aparente e concentração de etanol, na maioria das vezes, o valor exato da densidade não é encontrado, assim, faz-se necessário o uso de extrapolação.
- Nos processos industriais, todo fermentado segue para destilação, no entanto, neste procedimento, por causa do tipo de aparelho de destilação utilizado para recolher o etanol e para evitar o entupimento no condensador, a etapa de filtração é necessária.

Referências

- AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; LOPES, M. L. Sugar cane juice and molasses, beet molasses and sweet sorghum: composition and usage. In: INGLEDEW, W. M.; KELSALL, D. R.; AUSTIN, G. D.; KLUHSPIES, C. (Ed.). **The alcohol textbook: a reference for the beverage, fuel, and industrial alcohol industries**. Nottingham: University Press, 2009. v. 1, p. 39-46.
- AMORIM, H. V.; LOPES, M. L.; OLIVEIRA, J. V. de C.; BUCKERIDGE, M. S.; GOLDMAN, G. H. Scientific challenges of bioethanol production in Brazil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 91, n. 5, p. 1267-1275, 2011.
- BOTHAST, R. J.; SCHLICHER, M. A. Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 7, n. 1, p. 19-25, 2005.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Instrução de Trabalho: análise do grau alcoólico real**. Brasília, DF, 2013. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/laboratorios/credenciamento-e-laboratorios-credenciados/legislacao-metodos-credenciados/arquivos-metodos-da-area-bev-iqa/it-labv-023-rev01-analise-do-grau-alcoolico-real.pdf/view>>. Acesso em: 9 jul. 2020.
- BRITO, C. **Uso do DDGS, um subproduto na produção do etanol, na alimentação de monogástricos**. 2008. Disponível em: <<https://www.polinutri.com.br/upload/artigo/192.pdf>>. Acesso em: 9 jul. 2020.
- CARDONA, C. A.; SÁNCHEZ, Ó. J. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. **Bioresource Technology**, v. 99, n.13, p. 5270-5295, 2007.
- DARWIN; CORD-RUWISCH, R.; CHARLES, W. Ethanol and lactic acid production from sugar and starch wastes by anaerobic acidification. **Engineering in Life Sciences**, v. 18, n. 9, p. 635-642, 2018.
- HARDEN, A.; YOUNG, W. J. The alcoholic ferment of yeast- juice. Part III. The function of phosphates in the fermentation of glucose by yeast-juice. **Proceedings of the Royal Society B**, v. 80, n. 540, p. 299-311, 1908.
- KURAMBHATTI, C.; KUMAR, D.; SINGH, V. Impact of fractionation process on the technical and economic viability of corn dry grind ethanol process. **Processes**, v. 7, n. 9, article 578, 2019.
- LIMA, U. A. L.; AQUARONE, E.; BORZANI, W.; SCHIMIDELL, W. **Biotecnologia industrial: processos fermentativos e enzimáticos**. São Paulo: Edgard Blucher, 2001. v. 3.
- MAAREL, M. J. E. C. vander; VEEN, B. van der; UITDEHAAG, J. C. M.; LEEMHUIS, H.; DIJKHUIZEN, L. Properties and applications of starch-converting enzymes

of the alfa-amylase family. **Journal of Biotechnology**, v. 94, n. 2, p. 137-155, 2002.

MOUSDALE, D. M. **Introduction to bio-fuels**. Boca Raton: CRC Press: Taylor & Francis, 2010. 455 p.

PINAKI, D.; LHAKPA, W.; JOGINDER, S. Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF), an efficient process for bio-ethanol production: an overview. **Biosciences Biotechnology Research Asia**, v. 12, n. 1, p. 87-100, 2015.

RAMCHANDRAN, D.; JOHNSTON, D. B.; TUMBLESAN, M. E.; RAUSCH, K. D.; SINGH, V. Seasonal variability in ethanol concentrations from a dry grind fermentation operation associated with incoming corn variability. **Industrial Crops and Products**, v. 67, p. 155-160, 2015.

SINGH, V. Effect of corn quality on bio-ethanol production. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, n. 4, p. 353-355, 2012.

UNITED STATES DEPARTMENT AGRICULTURE. **U.S. Bioenergy Statistics**. 2019. Disponível em: <<https://www.ers.usda.gov/data-products/us-bioenergy-statistics/documentation/>>. Acesso em: 25 ago. 2020.

ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. (Coord.). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008. 1020 p.

Literatura Recomendada

CALIFORNIA ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **California-Modifed GREET pathway for the production of biodiesel from corn oil at dry mill ethanol plants**: version 2.0. Sacramento, 2011. 40 p.

CINELLI, B. A. **Produção de etanol a partir da fermentação simultânea à hidrólise do amido granular de resíduo agroindustrial**. 2012. 183 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

Anexo

Tabela 1 - Porcentagem de álcool em volume a 20°C (% v/v) correspondente à densidade relativa. Fonte: (Zenebon et al., 2008, p. 414).

D 20°C/20°C	% v/v						
1,00000	0,0	0,99632	2,5	0,99281	5,0	0,98956	7,5
0,99985	0,1	0,99618	2,6	0,99268	5,1	0,98944	7,6
0,99970	0,2	0,99603	2,7	0,99255	5,2	0,98931	7,7
0,99955	0,3	0,99589	2,8	0,99241	5,3	0,98919	7,8
0,99939	0,4	0,99574	2,9	0,99228	5,4	0,98906	7,9
0,99924	0,5	0,99560	3,0	0,99215	5,5	0,98893	8,0
0,99910	0,6	0,99546	3,1	0,99201	5,6	0,98881	8,1
0,99895	0,7	0,99531	3,2	0,99188	5,7	0,98869	8,2
0,99880	0,8	0,99517	3,3	0,99174	5,8	0,98857	8,3
0,99866	0,9	0,99503	3,4	0,99161	5,9	0,98845	8,4
0,99851	1,0	0,99489	3,5	0,99148	6,0	0,98833	8,5
0,99836	1,1	0,99475	3,6	0,99135	6,1	0,98820	8,6
0,99821	1,2	0,99461	3,7	0,99122	6,2	0,98807	8,7
0,99807	1,3	0,99447	3,8	0,99109	6,3	0,98794	8,8
0,99792	1,4	0,99433	3,9	0,99096	6,4	0,98782	8,9
0,99777	1,5	0,99419	4,0	0,99083	6,5	0,98770	9,0
0,99763	1,6	0,99405	4,1	0,99070	6,6	0,98758	9,1
0,99748	1,7	0,99391	4,2	0,99057	6,7	0,98746	9,2
0,99733	1,8	0,99377	4,3	0,99045	6,8	0,98734	9,3
0,99719	1,9	0,99363	4,4	0,99032	6,9	0,98722	9,4
0,99704	2,0	0,99349	4,5	0,99020	7,0	0,98710	9,5
0,99689	2,1	0,99336	4,6	0,99007	7,1	0,98698	9,6
0,99675	2,2	0,99322	4,7	0,98994	7,2	0,98686	9,7
0,99661	2,3	0,99308	4,8	0,98981	7,3	0,98674	9,8
0,99646	2,4	0,99295	4,9	0,98969	7,4	0,98662	9,9

Esta publicação está disponível no endereço:
<https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo/publicacoes>

Embrapa Milho e Sorgo

Rod. MG 424 Km 45
 Caixa Postal 151
 CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG
 Fone: (31) 3027-1100
 Fax: (31) 3027-1188
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição

Formato digital (2020)



MINISTÉRIO DA
 AGRICULTURA, PECUÁRIA
 E ABASTECIMENTO



**Comitê Local de Publicações
 da Unidade Responsável**

Presidente

Maria Marta Pastina

Secretária-Executiva

Elena Charlotte Landau

Membros

Cláudia Teixeira Guimarães, Mônica Matoso
 Campanha, Roberto dos Santos Trindade e
 Maria Cristina Dias Paes

Revisão de texto

Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica

Rosângela Lacerda de Castro (CRB 6/2749)

Tratamento das ilustrações

Mônica Aparecida de Castro

Projeto gráfico da coleção

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica

Mônica Aparecida de Castro

Foto da capa

Sandy R. Dias e Wilton S. Cardoso