

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE MINAS GERAIS  
UNIDADE FRUTAL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIÊNCIAS  
AMBIENTAIS**

**PRODUÇÃO DE ETANOL DE MILHO: EFEITO DE  
HÍBRIDOS, TEMPO E TEMPERATURA DE  
ARMAZENAMENTO DOS GRÃOS**

**Lucas Conegundes Nogueira  
Engenheiro Químico**

**FRUTAL-MG  
2021**

**LUCAS CONEGUNDES NOGUEIRA**

**PRODUÇÃO DE ETANOL DE MILHO: EFEITO DE  
HÍBRIDOS, TEMPO E TEMPERATURA DE  
ARMAZENAMENTO DOS GRÃOS**

Dissertação apresentada à Universidade do Estado de Minas Gerais, Unidade Frutal, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador  
Dr. Gustavo Henrique Gravatim Costa

**FRUTAL-MG  
2021**

Nogueira, Lucas Conegundes  
N778p Produção de etanol de milho: efeito de híbridos, tempo e temperatura de armazenamento dos grãos / Lucas Conegundes Nogueira. – 2021.  
57 f. : il., gráficos

Orientador: Gustavo Henrique Gravatim Costa.

Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado de Minas Gerais, Unidade Frutal, 2021.

Bibliografia: 11

1. Bioenergia. 2. Zea Mays. I. Costa, Gustavo Henrique Gravatim. II. Universidade do Estado de Minas Gerais, Unidade Frutal. III. Título.

CDD - 661  
CDU – 662.8



GOVERNO DO ESTADO DE MINAS GERAIS

LUCAS CONEGUNDES NOGUEIRA

**PRODUÇÃO DE ETANOL DE MILHO: EFEITO DE HÍBRIDOS, TEMPO E TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO DOS GRÃOS**

Dissertação apresentada à Universidade do Estado de Minas Gerais, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, área de concentração Multidisciplinar, Linha de Pesquisa Tecnologia, Ambiente e Sociedade, para à obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 11 de agosto de 2021.

Prof. Dr. Raul Andrés Martínez Uribe                      UNESP Tupã  
Profª. Dra. Osania Emerenciano Ferreira                UEMG Frutal

Prof. Dr. Gustavo Henrique Gravatim Costa  
Orientador



Documento assinado eletronicamente por **Raúl Andres Martínez Uribe, Usuário Externo**, em 11/08/2021, às 18:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 47.222, de 26 de julho de 2017](#).



Documento assinado eletronicamente por **Osania Emerenciano Ferreira, Professora de Educação Superior**, em 11/08/2021, às 18:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 47.222, de 26 de julho de 2017](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Henrique Gravatim Costa, Professor de Educação Superior**, em 11/08/2021, às 18:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 47.222, de 26 de julho de 2017](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [http://sei.mg.gov.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](http://sei.mg.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **33450062** e o código CRC **A5964F3E**.

## AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia, ao meu pai *João Feliciano Nogueira Filho*, minha mãe *Claudia Cristina Conegundes Nogueira* e ao meu irmão *João Vitor Conegundes Nogueira* por serem fundamental em toda minha caminhada, por cada apoio e conselho concedido.

Ao Professor Dr. Gustavo Henrique Gravatim Costa Orientador e amigo, pela paciência, pela compreensão e por todos os ensinamentos propostos ao longo de todos esses anos.

A Professora Dr. Osania Emerenciano Ferreria , amiga, por todo apoio concedido desde a chegada na universidade e a busca incessante dos materiais para desenvolvimento da pesquisa.

Aos meus colegas que me ajudaram no desenvolvimento deste projeto, Giovanni Uema Alcantara, Pedro Gomes, Igor de Oliveira, Bruna e Josiane.

Aos professores e colegas de Curso, por toda colaboração e apoio na finalização deste projeto.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pela bolsa de mestrado durante o início deste trabalho.

## RESUMO

O milho vem sendo utilizado como matéria-prima para produção de etanol nos estados de Goiás e Mato Grosso, por apresentar ciclo de 3 a 5 meses, sendo cultivado em áreas de renovação de canaviais, além da possibilidade de armazenamento e processamento na entressafra da cana-de-açúcar. Entretanto, os híbridos utilizados na região, bem como as condições de processamento, carecem de estudo. Pois, cabe ressaltar que, durante o armazenamento do grão nos silos, a temperatura se altera significativamente em decorrência da época do ano, assim como da localização geográfica. Esta produção de etanol pode ser influenciada de acordo com o tipo de híbrido utilizado no processamento, além do clima da região de instalação das indústrias podendo ocorrer alteração no rendimento decorrente da temperatura de armazenamento dos grãos de milho, a qualidade de armazenamento está diretamente relacionada com a temperatura, pois, interferem na qualidade dos grãos durante o armazenamento, acelerando as reações bioquímicas e metabólicas dos grãos. Sendo assim, o objetivo do projeto foi estudar os reflexos do processamento de grãos de três diferentes híbridos de milho, armazenados por seis períodos, em três diferentes temperaturas e o desempenho fermentativo de uma estirpe de levedura selecionada sobre a produção de etanol. Para o processamento dos grãos de milho para a produção de etanol, os grãos de milho foram triturados e imersos em água acidulada com adição da enzima  $\alpha$ -amilase, em seguida, o material foi aquecido a 100° C por 1 hora. As pastas foram resfriadas a temperatura ambiente, filtradas em peneira de 20 meshes e ajustadas o °Brix para 16° e o pH para 4,5, originando o mosto. Os mostos foram inoculados com a levedura industrial TR (Thermo-Resistente da LNF) com a adição da enzima glucoamilase. As fermentações foram mantidas em B.O.D. a 33°C. Ao longo do processo fermentativo foi avaliado o desenvolvimento fisiológico da levedura, as pastas, mostos e vinhos foram avaliados químico tecnologicamente. Dessa forma, conclui-se que a produção de etanol é influenciada pelos grãos de híbridos de milho processados, sendo o maior impacto ocorrendo no processo de hidrólise e para os três híbridos avaliados, a levedura não foi afetada na fermentação e nem no teor alcoólico. Quanto as temperaturas de armazenamento dos grãos de milho não influenciam sobre a fisiologia da levedura e o tempo de armazenamento por mais de 90 dias diminui significativamente o teor alcoólico do vinho.

**Palavras-chave:** Bioenergia. Grãos de milho. Levedura. Setor sucroenergético. Teor alcoólico.

# **PRODUCTION OF CORN ETHANOL: EFFECTS OF HYBRIDS, TIME AND TEMPERATURE OF GRAIN STORAGE**

## **ABSTRACT**

Corn has been used as a raw material for ethanol production in the states of Goiás and Mato Grosso, because it has a cycle of 3 to 5 months, being cultivated in areas of sugarcane plantation renewal, besides the possibility of storage and processing during the sugarcane inter-season. However, the hybrids used in the region, as well as the processing conditions, need to be studied. For, it should be noted that, during the storage of the grain in silos, the temperature changes significantly as a result of the time of year, as well as the geographical location. This ethanol production can be influenced according to the type of hybrid used in the processing, in addition to the climate of the region where the industries are installed, and there may be changes in the yield resulting from the storage temperature of corn grains. The storage quality is directly related to the temperature, because it interferes with the quality of the grains during storage, accelerating the biochemical and metabolic reactions of the grains. Thus, the objective of the project was to study the effects of grain processing of three different corn hybrids, stored for six periods at three different temperatures, and the fermentative performance of a selected yeast strain on ethanol production. To process the corn kernels for ethanol production, the corn kernels were crushed and immersed in acidulated water with the addition of the enzyme  $\alpha$ -amylase, then the material was heated at 100° C for 1 hour. The pastes were cooled to room temperature, filtered through a 20 meshes sieve, and adjusted the Brix to 16° and the pH to 4.5, originating the must. The musts were inoculated with industrial yeast TR (Thermo-Resistant from LNF) with the addition of the enzyme glucoamylase. Fermentations were maintained in B.O.D. at 33°C. Throughout the fermentative process, the physiological development of the yeast was evaluated, the pastes, musts, and wines were evaluated chemotechnologically. Thus, it is concluded that the ethanol production is influenced by the grains of corn hybrids processed, with the greatest impact occurring in the hydrolysis process, and for the three hybrids evaluated, the yeast was not affected in the fermentation and neither in the alcohol content. The storage temperatures of the corn grains do not influence the yeast physiology and the storage time for more than 90 days significantly decreases the alcohol content of the wine.

**Keywords:** Alcohol content. Bioenergy. Corn grain. Sugarcane sector. Yeast.

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Capítulo 3.</b>	
<b>Figura 1</b> – Filtração após a hidrólise .....	31
<b>Figura 2</b> – Valores médios obtidos para teor alcoólico e glicerol (%) dos vinhos obtidos de diferentes híbridos de milho. Teste F não significativo.....	37
<b>Capítulo 4.</b>	
<b>Figura 1</b> – Fermentação. A) B. O. D. B) Sacarímetro (°Brix=0) .....	45
<b>Figura 2</b> – Resultados médios obtidos para viabilidade celular, brotamento e viabilidade de brotos no início e final do processo fermentativo de pasta de milho obtida de grãos de milho armazenados em diferentes condições. Teste F foi não significativo para todos os tratamentos.....	48

## LISTA DE TABELAS

	Página
<b>Capítulo 3.</b>	
<b>Tabela 1</b> – Valores médios obtidos para °Brix, Açúcares Redutores Totais (ART), pH, Acidez Total, Compostos Fenólicos Totais e Amido da pasta de milho obtido de três híbridos.....	32
<b>Tabela 2</b> – Valores obtidos para Acidez Total, Compostos Fenólicos Totais e Amido do mosto de milho obtido de três híbridos.....	34
<b>Tabela 3</b> – Valores médios obtidos para Viabilidade Celular, Índice de brotamento e Viabilidade de brotos da levedura Thermo-Resistente, no início e final da fermentação do Mosto de milho obtido de três híbridos.....	35
<b>Tabela 4</b> – Valores médios obtidos para °Brix, Açúcares Redutores Residuais Totais (ARRT), pH, Acidez Total e Amido do vinho obtido da fermentação de mosto de milho três híbridos de milho.....	36
<b>Capítulo 4.</b>	
<b>Tabela 1</b> – Interação entre tempo e temperatura de armazenamento dos grãos sobre o °Brix da pasta.....	46
<b>Tabela 2</b> – Interação entre tempo e temperatura de armazenamento dos grãos sobre os açúcares redutores totais da pasta .....	46
<b>Tabela 3</b> – Interação entre tempo e temperatura de armazenamento dos grãos sobre o teor de amido (%) da pasta.....	47
<b>Tabela 4</b> – Interação entre tempo e temperatura de armazenamento dos grãos sobre o pH do vinho.....	49
<b>Tabela 5</b> – Interação entre tempo e temperatura de armazenamento dos grãos sobre os açúcares redutores residuais totais do vinho.....	49
<b>Tabela 6</b> – Interação entre tempo e temperatura de armazenamento dos grãos sobre o glicerol do vinho.....	50
<b>Tabela 7</b> – Interação entre tempo e temperatura de armazenamento dos grãos sobre o Teor alcoólico do vinho.....	50
<b>Tabela 8</b> – Valores médios obtidos para análises microbiológicas da levedura durante o processo fermentativo de mosto preparado a partir de grãos de diferentes híbridos de milho, armazenados por diferentes épocas e em diferentes temperaturas.....	56

## SUMÁRIO

	PÁGINA
<b>RESUMO.....</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>7</b>
<b>CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>11</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>12</b>
2.1 Objetivo geral .....	12
2.2 Objetivos específicos .....	12
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>12</b>
<b>CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>14</b>
2.1 Milho ( <i>Zea mays</i> ).....	14
2.2 Processamento do milho para produção de bioetanol.....	15
2.3 Hidrólise Enzimática.....	16
2.4 Levedura .....	17
2.5 Processo Fermentativo.....	19
2.6 Destilação.....	21
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>22</b>
<b>CAPITULO 3 - PRODUÇÃO DE ETANOL É INFLUENCIADA POR DIFERENTES HÍBRIDOS DE MILHO .....</b>	<b>27</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>27</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>28</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>29</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>32</b>
<b>4. CONCLUSÃO.....</b>	<b>37</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>37</b>
<b>CAPÍTULO 4 – TEMPO E TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO DOS GRÃOS DE MILHO AFETAM AS CARACTERÍSTICAS DA PASTA PARA PRODUÇÃO DE</b>	

<b>ETANOL.....</b>	<b>40</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>40</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>41</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>42</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>44</b>
2.1 Delineamento experimental .....	44
2.2 Preparo da pasta .....	44
2.3 Preparo do mosto e fermentação.....	44
<b>3. RESULTADOS .....</b>	<b>46</b>
<b>4. DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>
<b>5. CONCLUSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>53</b>
<b>APÊNDICE .....</b>	<b>56</b>

## CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO GERAL

Atualmente o setor sucroenergético apresenta significativa importância na economia do Brasil, sendo responsável pela produção de açúcar, etanol e energia elétrica, originados do processamento agroindustrial da cana-de-açúcar. Considerando-se o etanol, observa-se que somente na safra 2020/21 foram produzidos 32,7 bilhões de litros (CONAB, 2021).

Devida a alta demanda por este biocombustível, se faz necessário a busca por alternativas que possam complementar a produção de etanol no país, objetivando atender a futura demanda por este combustível. Desta maneira, destaca-se o milho, que apresenta ciclo de 3 a 5 meses, pode ser plantado nas áreas de renovação de canaviais e além disso, ser armazenado em silos convencionais (EMBRAPA, 2015).

No Brasil, os estados de Mato Grosso e Goiás destacam-se por produzir etanol do milho há 5 anos, uma vez que a região apresenta elevada quantidade de milho e cana-de-açúcar. Já no triângulo sul mineiro as condições podem ser favoráveis a esse pacote tecnológico, pois há uma tecnologia que conjuga rentabilidade e preservação ambiental, trata-se de um consórcio de cana-de-açúcar com milho, onde é modificado a logística de plantio de cana, antecipando o plantio da cultura para o início do período chuvoso (CONAB, 2021; EMBRAPA, 2021).

Além disso, destaca que há usinas que produzem apenas etanol a partir do milho, ou ainda há unidades produtoras que podem processar tanto cana-de-açúcar ou milho. Neste segundo modelo de produção, os grãos de milho são armazenados em silos e processados na entressafra da cana-de-açúcar, período em que a usina está inativa decorrente da não maturação desta cultura. Assim as unidades agroindustriais aumentam seu tempo de operação efetiva durante o ano, saindo dos atuais 270 dias para 330 dias (CRUZ et al. 2008).

Deve-se destacar que os equipamentos necessários para esta produção são anexados aos atuais parques industriais, resultando nas Usinas Flex - Cana e Milho (DONKE et al. 2016).

Embora esta tecnologia seja utilizada e difundida em países como Estados Unidos e China, se faz necessário a adaptação do processo as condições operacionais, tais como os híbridos amplamente cultivados, tempo de armazenamento, temperatura do armazém e leveduras selecionadas (NOVACANA, 2021).

Cabe ressaltar que, durante o armazenamento do grão nos silos, a temperatura se altera significativamente em decorrência da época do ano, assim como da localização geográfica do

mesmo. Essas condições podem resultar em alterações fisiológicas do milho. Além disso, o elevado tempo de armazenamento nessas condições também pode ser um fator preponderante nas características finais do grão no silo (SBRUSSI; ZUCARELI, 2015),

Dessa forma, esse projeto propõe estudar variáveis que melhorem a produção de etanol sem grandes aumentos do custo. Assim, se faz necessário o estudo de híbridos de milhos, de temperaturas de armazenamento dos grãos e os reflexos sobre o teor de açúcares extraídos e o desempenho da fermentação etanólica.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O objetivo do trabalho foi estudar os reflexos do processamento de grãos de três diferentes híbridos de milho, armazenados por seis períodos, em três diferentes temperaturas e o desempenho fermentativo de uma estirpe de levedura selecionada sobre a produção de etanol.

### **2.2 Objetivos específicos**

- ✓ Avaliar as características químico tecnológicas das pastas, mostos e vinhos dos híbridos de milho Dekalb 636, Pioneer 3754 e Syngenta 8454;
- ✓ Avaliar os efeitos do tempo de armazenamento do milho (0, 30, 60, 90, 120 e 180 dias após a colheita) nas temperaturas de 25°C, 35°C e 45°C, sobre as características químico tecnológicas, e os reflexos sobre a produção de etanol e o armazenamento dos grãos de milho;
- ✓ Avaliar o desempenho fermentativo da estirpe da levedura selecionada TR da LNF quanto as características químico tecnológicas dos vinhos obtidos no processamento;

## **REFERÊNCIAS**

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: Cana-de-açúcar**, maio 2021 – Safra 2021/2022. Boletim, Brasília v. 8, n. 3, p. 1-56, 2021.

CRUZ, J. C.; PEREIRA FILHO, I. A.; ALVARENGA, R. C.; GONTIJO NETO, M. M.; OLIVEIRA, M. F.; MATRANGOLO, W. J. R. **Manejo da cultura do milho**, EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agrícola, [s. l.], p. 364-370, 2008. Disponível em: <https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo/busca-de-publicacoes/-/publicacao/491872/manejo-da-cultura-do-milho> Acesso em: 17 de maio de 2021.

DONKE, A. C. G.; VIÑAS, R.; MATSUURA, M. I. S. F.; MATAI, P. H. L. S.; KULAY, L. A. **Usina Flex**: comparação dos desempenhos ambiental e energético do etanol de cana-de-açúcar, milho e sorgo. V Congresso Brasileiro Em Gestão Do Ciclo Da Vida. Fortaleza, CE. 2016.

EMBRAPA - **Empresa Brasileira de Pesquisa Agrícola. Cultivo do milho**, Filho, I. A. P. F. (ed.), 2015. Disponível em: < [https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p\\_p\\_id=conteudoportlet\\_WAR\\_sistemasdeproducaolf6\\_1gal1ceportlet&p\\_p\\_lifecycle=0&p\\_p\\_state=normal&p\\_p\\_mode=view&p\\_p\\_col\\_id=column-2&p\\_p\\_col\\_count=1&p\\_r\\_p\\_-76293187\\_sistemaProducaoId=7905&p\\_r\\_p\\_-996514994\\_topicoId=8658](https://www.spo.cnptia.embrapa.br/conteudo?p_p_id=conteudoportlet_WAR_sistemasdeproducaolf6_1gal1ceportlet&p_p_lifecycle=0&p_p_state=normal&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-2&p_p_col_count=1&p_r_p_-76293187_sistemaProducaoId=7905&p_r_p_-996514994_topicoId=8658) >. Acesso em: 14 de maio de 2021.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agrícola. **Consórcio cana-de-açúcar com milho**: tecnologia será lançada na próxima quinta-feira (14), Caldas, J. (ed.), 2021. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/65379422/consorcio-cana-de-acucar-com-milho-tecnologia-sera-lancada-na-proxima-quinta-feira-14> >. Acesso em: 12 de outubro de 2021.

NOVACANA. **As projeções de produção de cana, açúcar e etanol para a safra 2023/24 da Fiesp/MB Agro**, ©2021. Disponível em: < <https://www.novacana.com/estudos/projecoes-producao-cana-acucar-etanol-safra-2023-2024-fiesp-mb-agro/> >. Acesso em: 23 de maio de 2021.

SBRUSSI, C. A. G.; ZUCARELI, C. Germinação sob altas temperaturas para avaliação do potencial fisiológico de sementes de milho. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 10, 2015.

## CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Milho (*Zea mays*)

O milho é uma planta C4 de ciclo curto (90 a 120 dias). Durante seu desenvolvimento vegetativo, a planta armazena as moléculas de glicose produzidas durante o processo fotossintético em grãos, na forma de amido. A composição química do grão de milho em porcentagem de massa seca consiste em 72,7% de amido, 10,1% de proteína, 3,4% de lipídeos, 5,2% de fibras e 1,9% de cinzas (PAES, 2006; SRICHUWONG et al. 2010).

As cultivares de milho podem ser subdividas em híbridos e variedades. Os híbridos são aqueles obtidos pelo cruzamento forçado entre duas plantas de linhagens puras diferentes. Em geral, as sementes híbridas geram plantas com alto vigor e produtividade, porém, necessitam de ótimas condições de crescimento, com quantidades específicas de fertilizantes, água e agrotóxicos. Já as variedades são plantas geradas pela polinização natural, heterogêneas, porém com características semelhantes às dos pais (AGRIC, 2011; EMBRAPA, 1990).

No país, o cultivo pode ocorrer em dois períodos: verão (safra) e inverno (safrinha). Considerando-se o estado de Minas Gerais, o plantio de safra ocorre entre outubro e dezembro e colheita entre fevereiro a junho; enquanto o plantio de safrinha inicia-se em janeiro a março, e a colheita entre junho e setembro (CONAB, 2021).

Para o plantio, é preciso uma profundidade com a sementeira que varia entre 3 a 7 cm dependendo da textura do solo, a densidade de plantio entre 30.000 e 90.000 plantas.ha<sup>-1</sup>, com espaçamento entre fileiras de 0,5 a 0,8m (CRUZ et al. 2008).

A colheita do milho é realizada mecanicamente, sendo as espigas debulhadas para a separação dos grãos, que podem ser acondicionados em sacos de 60 kg, ou ainda armazenados a granel em silos (MANTOVANI, 1989).

No Brasil, a safra 2020/2021 estima-se que serão produzidos no Brasil aproximadamente 93,3 milhões de toneladas de grãos, a partir do cultivo em 19,83 milhões de hectares de área, com produtividade média de 4,7 toneladas de grãos por hectare (CONAB, 2021).

## 2.2 Processamento do milho para produção de bioetanol

A produção de etanol de milho pode ser realizada utilizando-se grãos recentemente colhidos, ou ainda que estejam armazenados em silos. A seguir, estes são triturados para aumentar a superfície exposta e facilitar a extração das moléculas de amido, adicionando, posteriormente, a água (CEREDA, 2001).

O processo de trituração é realizado para padronizar as amostras em superfícies de contato com 1,18mm de tamanho, o que facilita a extração de amido com maior eficiência. A seguir é adicionado água acidulada, ou seja, água com pH ácido (5,5) que facilita a remoção de amido presente nas moléculas (NOGUEIRA et al. 2017; ALCANTARA et al. 2017).

Esta solução é submetida a aquecimento até temperaturas de 100°C (cozimento), promovendo a “gelatinização” das moléculas de amido presentes nos grãos (LEHNINGER et al., 2000), formando uma pasta.

Cabe ressaltar que a gelatinização consiste no colapso (rompimento) da ordem das moléculas dentro dos grânulos de amido com mudanças irreversíveis nas propriedades, como o aumento dos grânulos, fusão de cristais, perda da ordem cristalina, aumento da viscosidade (SINGH et al., 2003; BENINCA, 2008). A gelatinização ocorre inicialmente na região amorfa do grânulo (no hilo) e segue rapidamente para a periferia (SINGH et al., 2003). Na temperatura de gelatinização as ligações de hidrogênio entre as cadeias de amilose e amilopectina tornam-se mais fracas e são rompidas, promovendo redução da cristalinidade, o que possibilita a entrada de água e inchaço dos grânulos (HOOVER, 2001).

Essas temperaturas de gelatinização variam entre os amidos de diferentes fontes. SINGH et al. (2003) citam valores na faixa de 61 a 72°C para a batata, 68 a 74°C para o milho, 65 a 79°C para o arroz e 56 a 62°C para o trigo. Os amidos de farinha de mandioca e de batata-doce apresentam, respectivamente, valores de 70,4°C e 74,2°C (SHARIFFA et al., 2009).

A pasta é o processo de filtragem onde ocorre a separação do líquido viscoso dos grãos de milho após extração de amido, o líquido se torna a pasta e o restante acaba-se tornando o DDG (*dried distillers grains*) que significa grãos secos destilados com solúveis. O DDG é um subproduto com alto valor proteico economicamente viável nas regiões onde é produzido sendo utilizado como ração animal para bovinos de corte e leite, ovinos e caprinos, equinos, aves e suínos substituindo alimentos padrões como farelo de soja, farelo de algodão, torta de algodão e entre outros, alimentos proteicos e energéticos (KIM et al. 2008).

Considerando-se que a molécula de amido é infermentescível por leveduras do gênero *Saccharomyces cerevisiae* (WALKER, 1998), se faz necessário à hidrólise desta molécula em dímeros de glicose. Este processo consiste na adição de enzima  $\alpha$ -amilase, que quebra as ligações  $\alpha$ -1,4 das moléculas de amido, em período de 30 minutos em retenção (solução em contato com a enzima). A pasta de milho é resfriada a 32°C, ajustando-se o pH a 4,5 e a concentração de açúcares para valores próximos a 18° Brix, originando o mosto (BOTHAST; SCHLICHER, 2004).

A seguir é adicionado ao mosto a enzima glucoamilase, a seguir, inocula-se no mosto leveduras, iniciando-se o processo fermentativo. Para o milho, o tempo de fermentação é de 24-48 horas. Após consumo de todos os açúcares presentes, o mosto fermentado (vinho) é direcionado a colunas de destilação para recuperação do etanol (BOTHAST; SCHLICHER, 2004). Atualmente, são utilizadas no processo fermentativo leveduras selecionadas que aumentam os rendimentos em etanol da indústria. Entre estas, pode-se citar a CAT-1, PE-2, BG, SA, FT858 e Thermo-Resistente, amplamente utilizadas pelas unidades sucroenergéticas brasileiras, por permanecerem no processo durante toda a safra, possuem elevada viabilidade celular e índice de brotamentos, assim como alto teor de etanol (BASSO, 2011).

### **2.3 Hidrólise Enzimática**

O amido é considerado uma reserva energética de plantas amiláceas como milho, arroz, trigo, aveia, mandioca, e ao ser tratado com ácido ou via enzimática suas frações de amilose e amilopectina hidrolisam lentamente originando dextrina, maltose e finalmente glicose. Em processos industriais de conversão de amido em açúcar fermentescível utilizam-se basicamente duas enzimas:  $\alpha$ -amilase e glucoamilase (KLAUCK et al. 2001).

As enzimas amilolíticas representam o grupo enzimático de grande aplicação industrial. A alfa-amilase é uma endoenzima carboidrase com atividade hidrolítica das ligações  $\alpha$ -1,4 em polissacarídeos dispersos em meio aquoso, contendo, pelo menos, três resíduos de glicose na cadeia. Algumas alfa-amilases apresentam atividade de hidrólise das ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,6, mas com eficiência reduzida (LÉVEQUE et al., 2000; SUVD et al., 2001).

A amiloglucosidase é uma enzima sacarificante utilizada para produzir glicose a partir do amido, hidrolisando ligações tipo  $\alpha$ -1,4 e  $\alpha$ -1,6. A ação da amiloglucosidase é lenta no ataque

inicial à amilose, pois, sendo uma exoenzima, só atua a partir da extremidade não-redutora e não penetra no interior da estrutura helicoidal da amilose (OBEL, 2001).

Além disso, quando a matéria-prima possui elevada quantidade de fibras, pode-se fazer uso da enzima celulase de forma a diminuir a interferência da fibra no meio. O processo de hidrólise enzimática do amido é realizado, segundo Reguly, em três etapas: gelatinização, liquefação e sacarificação. Na gelatinização os grânulos de amido hidratam e expandem, resultando no inchamento dos grãos e na solubilização da amilose. Durante a liquefação a viscosidade do meio diminui rapidamente e a etapa da sacarificação é responsável pela transformação completa do amido em glicose (KLAUCK et al. 2001).

Quanto a temperatura de gomificação varia bastante entre os amidos de diferentes fontes botânicas, oscilando na faixa de 65 a 105°C, sendo necessário muitas vezes o emprego de altas temperaturas para a total gomificação (TORRES et al. 2012).

Após a liquefação, a solução de maltodextrina é hidrolisada em glicose por uma enzima desramificante, seja endoenzima (isoamilase e pululanase) ou uma exoenzima ( $\beta$ -amilase e glicoamilase), atuando sobre as ligações glicosídicas  $\alpha$ -1,6 da amilopectina (MAAREL et al., 2002). O resultado dessa segunda etapa é uma solução de sacarídeos de baixo peso molecular como glicose e maltose (TORRES et al. 2001; CARVALHO, 2020).

## 2.4 Levedura

As leveduras são organismos pertencentes ao grupo dos fungos, as quais se apresentam predominantemente sob a forma unicelular, diferenciando-se dos fungos verdadeiros (ou mofos) que são organismos geralmente multicelulares. Contudo, exercem papel similar ao das bactérias, sendo tipicamente consumidores de matéria orgânica. Sua reprodução vegetativa se faz, geralmente, por gemulação (brotamento) (SANTIN, 1996).

Sua reprodução pode ser sexuada ou assexuadamente. No primeiro caso, a reprodução se faz pela formação de ascósporos, ou seja, esporos contidos numa espécie de saco. Existem leveduras que não realizam este tipo de reprodução, são as chamadas "falsas leveduras" e classificadas entre os *Fungi imperfecti* (JOHN, 2014; MDC, 2019)

A reprodução assexuada envolve dois processos interessantes: a mitose e a meiose. A mitose ocorre quando há bastante alimento disponível. A célula diplóide duplica seus dois jogos

de cromossomos e faz a célula temporariamente quadriplóide (quatro jogos de cromossomos), isso faz com que cresça um broto (SANTIN, 1996; JOHN, 2014).

O broto contém um jogo duplo de cromossomos e ainda cresce como uma célula independente presa à célula mãe e eventualmente separa-se deixando uma cicatriz onde os brotos aconteceram. Uma célula que não tem mais nenhuma área sem cicatrizes por onde possa ocorrer o brotamento eventualmente morre. Os brotos podem acontecer continuamente contanto que haja alimento disponível (SANTIN, 1996).

Além disso, é possível realizar a análise de viabilidade celular das leveduras, onde é realizada a imersão de células de levedura em uma solução contendo corante azul (azul de metileno - ringer), onde que as leveduras mortas, por perderem a permeabilidade seletiva da membrana permite que o corante entre dentro da célula, tornando-a azul, diferenciando assim, células vivas das mortas, células vivas mais broto vivo ou morto (LEE et al. 1981).

Desde o começo dos anos 2000, muitos produtores têm se convertido para as leveduras selecionadas, cultivadas em laboratórios especializados, entre elas CA-11, CANAMAX, CAT-1, BG-1, PE-2, Thermo-Resistente e entre outras (LNF, 2021).

Como as leveduras são isoladas e reintroduzidas na própria usina, estão adaptadas ao processo da unidade, por isso apresentam persistência, dominância e podem ter suas habilidades melhoradas para trabalhar de acordo com as particularidades da usina e de sua matéria-prima. É o caso da levedura PE-2, uma das mais utilizadas atualmente no Brasil (FERMENTEC, 2021; LNF, 2021).

A cepa *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 é utilizada na fermentação do mosto da cana e de melão com reciclós e tolerante a teores alcoólicos de até 15% (v/v). Baixa formação de espuma, alta capacidade de implantação, resistência e dominância na fermentação são suas principais características (FERMENTEC, 2021; LNF, 2021).

Já a levedura selecionada TR, conhecida como Thermo-resistente da empresa LNF é utilizada principalmente nos Estados Unidos para fermentações com mosto de milho, pois, tem como vantagem, resistente a choques de pH, não são floculantes, absorve carboidratos liberados no processo de hidrólise e são resistentes a altas temperaturas e fermentações por longos tempos (LNF, 2021).

Dessa forma, o etanol pode ser produzido através de carboidratos fermentescíveis pela levedura, como: sacarose, frutose, glicose, maltose, rafinose e outros, os quais podem ser encontrados em melão de cana, milho, beterrabas, malte, batatas, cevada, aveia, arroz, sorgo

etc. (MAY, 2008). A produção de etanol se inicia aerobiamente para produzir o máximo de biomassa, como isso, o processo tem as seguintes etapas: preparo do substrato, correção do mosto, preparo do inóculo, fermentação e destilação (PEREIRA, 2010).

## 2.5 Processo Fermentativo

Segundo Gaden (1959), fermentação é todo processo microbiológico que visa à produção de uma determinada substância. No caso das unidades sucroenergéticas, o micro-organismo utilizado é a levedura do gênero *Saccharomyces cerevisiae*, e o produto de interesse é o Bioetanol.

Neste processo, além do etanol, são produzidos gás carbônico, glicerol, ácidos orgânicos, acetoína, acetaldeído, álcoois superiores (iso-amílico, iso-butílico, n-propílico), butilenoglicol, assim como ocorre a formação de biomassa. Estima-se que somente 90% da glicose metabolizada seja convertidas em Bioetanol (rendimento prático), sendo os 10% restantes, produtos secundários da fermentação, interferências de compostos orgânicos, inorgânicos e de micro-organismos contaminantes (INGLEDEW, 2009).

Cabe ressaltar que este processo ocorre em anaerobiose, ou seja, na ausência de oxigênio no meio, ou pela elevada concentração de açúcares no substrato (efeito Crabtree). Admite-se que concentrações de açúcares no meio superior a 6% ativa o processo metabólico fermentativo da levedura, que a partir de 100g de Açúcares Redutores Totais, produz 9 Kcal de ATP, 51,1g de etanol, 48,9g de CO<sub>2</sub> e 1-5g de biomassa. Em contrapartida, concentrações do substrato inferior a 6% ativa a via respiratória deste micro-organismo, sendo produzidos a partir de 100g de Açúcares Redutores Totais, 168 Kcal de ATP, 47g de biomassa, 108g de água e 264g de CO<sub>2</sub> (BASSO, 2011; VENTURINI-FILHO et al. 2013).

Deve-se considerar ainda que o desenvolvimento metabólico da levedura ocorre em faixa ótima de temperatura de 28-32°C (LIMA et al. 2001), sendo que temperaturas inferiores aumentam o tempo de fermentação, e elevadas temperaturas inibem o crescimento celular, principalmente na presença de altas concentrações de etanol (STUPIELLO; HORI, 1981).

Considerando que as leveduras são acidófilas, ou seja, desenvolvem-se adequadamente em meios ácidos, a faixa de pH ideal da ordem de 4,0-4,5. Nestes valores, além de ocorrer favorecimento a levedura, reduz a multiplicação de bactérias contaminantes, aumentando os rendimentos da fábrica (AMORIM et al. 1996).

Além da concentração de açúcares no mosto, temperatura e pH, a levedura necessita de teores de nitrogênio entre 100-300 mg.L<sup>-1</sup>, fósforo de 50-250 mg.L<sup>-1</sup>, potássio de 700-1300 mg.L<sup>-1</sup>, magnésio 100-200 mg.L<sup>-1</sup>, zinco, cobre e manganês de 1 a 5 mg.L<sup>-1</sup>. Deve-se considerar ainda que o mosto deve apresentar concentrações de enxofre, cálcio e alumínio menores possíveis, pois podem afetar negativamente o metabolismo da levedura (STEIDL, 2010).

Dessa forma, após preparo do mosto, inocula-se a levedura selecionada numa proporção de 8 a 12% do volume a ser fermentado mantendo na temperatura de 32 a 35° C (AMORIM et al. 1996).

Porém, existem dois tipos de processo de fermentação, contínuo ou descontínuo (batelada). No processo contínuo envolvem uma série de tanques de fermentação operando em série, com uma recirculação de levedura do último ao primeiro fermentador. Em geral, sistemas contínuos nem sempre têm conseguido alcançar os rendimentos obtidos por sistemas de bateladas. A contaminação é mais provável num sistema contínuo e se ocorrer, as perdas são altas. A fermentação contínua atingiu um pico de 50 % da produção do Brasil, mas subsequentemente caiu a cerca de 25 %. A fermentação de bateladas é uma opção mais segura, mas a longo prazo, com melhores sistemas de controle e medição, a fermentação contínua pode vir a ser o melhor sistema (CNPEM, 2017; REIN, 2013).

O sistema de fermentação em bateladas que é o utilizado em fermentações de opera sem recirculação de levedura. Cada batelada pode ser iniciada com levedura nova, ou com mais frequência certa quantidade de levedura é retirada de uma batelada anterior para ser usada como levedura de semente num tanque de propagação de fermento. Cada batelada é iniciada num pré-fermentador, no qual ar é injetado para a fase de crescimento aeróbico e na qual o pH é ajustado e os nutrientes são adicionados (REIN, 2013).

A concentração de levedura tem de estar no nível correto antes da passagem para um dos fermentadores principais. A alimentação é adicionada aos fermentadores progressivamente à medida que o açúcar fermenta. A velocidade na qual a alimentação é adicionada determina a concentração de açúcares. Este procedimento é comumente referido como um sistema de alimentação em batelada (REIN, 2013).

O sistema tradicional para a produção de etanol combustível praticado no Brasil é o sistema Melle-Boinot, pelo qual a levedura é continuamente separada do mosto fermentado em centrífugas tipo disco de alta velocidade e recirculado de volta à fermentação. Este sistema também é utilizado em usinas de milho, pois tem a vantagem significativa devido a que a

concentração de levedura pode ser mantida alta em cerca de  $800 \times 10^6$  células/mL, propiciando velocidades de fermentação elevadas, e por isso, volumes de fermentação menores; volume de fermentador de 6-8 m<sup>3</sup> para cada m<sup>3</sup>/dia etanol produzido é comum. Os tempos de fermentação são baixos, menos do que 12 h e atingindo em média cerca de 8,5h, por causa da alta concentração de levedura. Além disso, menos é consumido carboidrato para produzir a levedura e, portanto, pelo menos teoricamente, isto resulta em rendimentos de fermentação maiores. É necessário limitar a contaminação bacteriana através de lavagem da levedura com ácido, e a adição ocasional de antibióticos é necessária (REIN, 2013).

Uma das principais características da fermentação em batelada é o seu volume, que permanece constante, tendo em vista que não há adição de soluções para o controle do processo e nem perdas de material por evaporação (CNPEM, 2017).

## **2.6 Destilação**

No processo de produção de etanol de milho, a destilação ocorre com a levedura e os grãos de milhos triturados que ficaram em suspensão. Na sequência, a vinhaça (que tem esses materiais) é filtrada para recuperação de um sólido, o qual será seco, originando o DDG.

Sendo assim, o vinho é centrifugado afim de separar as leveduras do vinho alcoólico, as leveduras recebem um tratamento químico para serem reutilizadas no processo de fermentação quando o processo é contínuo, quando em batelada são utilizadas novas leveduras para o processo de fermentação (PAYNE, 2010).

A seguir, o vinho alimenta a coluna de destilação e é iniciado o aquecimento pelos vapores emitidos pelo topo da coluna de vinho e a seguir pela troca de calor com a vinhaça que deixa a coluna de destilação. O vinho fermentado aquecido entra no topo da coluna de destilação e a vinhaça sem etanol sai pela base da coluna. Este etanol do topo da coluna de retificação é produzido como uma mistura azeotrópica etanol-água de ponto de ebulição constante contendo cerca de 96 % de etanol (REIN, 2013).

Para remover a água remanescente, é necessário introduzir uma terceira fase no sistema, denominada arrastadora, usualmente benzeno ou ciclohexano. Este agente arrastador forma um azeótropo com ponto de ebulição menor do que o do etanol retificado e isto permite a remoção final de água. A separação é feita na coluna de desidratação da qual o etanol produzido é removido como corrente da base da coluna (LIMA et al. 2001; REIN, 2013).

Uma alternativa à destilação azeotrópica recente e atualmente mais frequentemente utilizada é a desidratação por peneiras moleculares. O etanol deixa a retificação na fase vapor, é aquecido ainda mais com vapor, e a seguir a água é adsorvida do vapor em leitos compactos de zeólito. Periodicamente estes adsorventes precisam ser regenerados por inundação com vapor de etanol anidro sob vácuo, que extrai a água que é retornada à coluna de retificação para recuperação do etanol nela contido. O consumo de vapor neste Sistema consideravelmente mais baixo (REIN, 2013).

As vantagens do processo incluem colunas menores e um consumo menor de vapor do que na destilação azeotrópica. Após a destilação, o etanol é resfriado e bombeado aos tanques de medição e destes aos tanques de estocagem do produto. É produzido com teor de 99,8 % de etanol, e é desnaturado antes de ser bombeado a vagões-tanques ou caminhões-tanques para transporte aos depósitos das empresas distribuidoras de combustíveis. A eficiência da destilação é normalmente muito alta e um valor de 99% é comumente assumido para a recuperação de etanol na destilação (MOULIN et al. 1984; REIN, 2013).

As colunas de destilação geralmente usam pratos perfurados, ou alguma variação de bandejas que têm sido convencionalmente usadas no Brasil. Os pratos perfurados têm a vantagem de serem capazes de operar numa faixa ampla de vazões com alta eficiência, e são particularmente úteis na coluna de destilação, porque a incrustação pode ser severa nesta coluna e eles são mais fáceis de limpar.

## REFERÊNCIAS

AGRIC. **Variedades x Híbridos** - Qual a diferença? [s. l.], 2011. Disponível em: <[https://www.agric.com.br/termos\\_tecnicos/variedades\\_vs\\_hibridos.html](https://www.agric.com.br/termos_tecnicos/variedades_vs_hibridos.html)>. Acesso em: 19 de junho de 2021.

ALCANTARA, G. U.; NOGUEIRA, L. C.; MOYA, S. M.; COSTA, G. H. G. Reflexos dos tempos de cozimento sobre a quantidade de açúcares obtidos de grãos de milho de 2,36mm. p. 992-996. 2017. In: Anais do XII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica - **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, São Paulo, v. 1, n. 4, 2017.

AMORIM, H. V.; BASSO, L. C.; ALVES, D. G. **Processos de produção de álcool**: Controle e monitoramento. [S. l.: s.n.], p. 93, 1996.

BASSO, L.C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S.N. **Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation, Biofuel Production-Recent Developments and Prospects**, p. 5-100, set. 2011. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/biofuel-production-recent-developments-and-prospects/ethanol-production-in-brazil-the-industrial-process-and-its-impact-on-yeast-fermentation> Acesso em: 21 de ago. de 2020.

BENINCA, C. **Emprego de técnicas termoanalíticas na análise de amidos nativos e quimicamente modificados de diferentes fontes botânicas**. Programa de Pós- Graduação Stricto sensu Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008.

BOTH EAST, R. J.; SCHLICHER, M.A. Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 67, n. 1, 2004.

CARVALHO, L. T. **Processo produtivo do etanol de milho: sacarificação**, 2020. Disponível em: < <https://www.bioblog.com.br/processo-produtivo-do-etanol-de-milho-sacarificacao/> >. Acesso em: 25 de jul. de 2021.

CEREDA, M. P. **Propriedades gerais do amido**. (Serie: Culturas de tuberosas amiláceas Latino-Americanas) São Paulo, Fundação Cargill, v. 1, p. 221. 2001.

CNPEN - Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais. **Fermentação contínua ou em batelada?** 2017. Disponível em: < <https://cnpem.br/fermentacao-continua-ou-em-batelada/> >. Acesso em: 12 de jul. de 2021.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: Grãos**, julho 2021 – Safra 2020/2021. Brasília, v. 8, n. 1, p. 1-56.

CRUZ, J. C.; PEREIRA FILHO, I. A.; ALVARENGA, R. C.; GONTIJO NETO, M. M.; OLIVEIRA, M. F. de; MATRANGOLO, W. J. R. **Manejo da cultura do milho**, Embrapa, 2008. Disponível em: < <https://www.embrapa.br/milho-e-sorgo/busca-de-publicacoes/-/publicacao/491872/manejo-da-cultura-do-milho> >. Acesso em: 17 de maio de 2021.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Cultivares x Híbridos – Conceitos básicos**. 1990. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/47785/1/Cultivares-hibridos.pdf> Acesso em: 19 de jun. de 2021.

FERMENTEC. **Leveduras personalizadas**, 2021. Disponível em: < <https://www.fermentec.com.br/> >. Acesso em: 05 de ago. de 2021.

GADEN, E. L. Fermentation Process Kinetics. **Journal of Biochemical and Microbiological Technology and Engineering**, [s. l.], v. 1, n. 4. p. 413-429, 1959.

HOOVER, R. Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v.45, n.3, p.253-267. 2001.

INGLEDEW, W. M. **Yeast: physiology, nutrition, and ethanol production. The alcohol textbook**. 5th ed. Nottingham: Nottingham University Press, p. 101-113, 2009.

JOHN, L. **Nova levedura promove fermentação eficiente do caldo de cana**, 2014. Disponível em: <https://exame.com/tecnologia/nova-levedura-promove-fermentacao-eficiente-do-caldo-de-cana/> Acesso em: 09 de ago. de 2021.

KIM, Y.; MOSIER, N. S.; HENDRICKSON, R.; EZEJI, T.; BLASCHEK, H.; DIEN, B.; COTTA, M.; DALE, B.; LADISCH, M. R. Composition of corn dry-grind ethanol by-products: DDGS, wet cake, and thin stillage. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 99, n. 12, p. 5165-5176, 2008.

KLAUCK, E.; JAHN, S. L.; GASPAROTTO, J. M.; WERLE, L. B.; MAYER, F. D. **Análise de diferentes condições operacionais na hidrólise e fermentação do amido de mandioca**, 2001. Disponível em: [https://portal.ufsm.br/jai2010/anais/trabalhos/trabalho\\_1041273700.htm](https://portal.ufsm.br/jai2010/anais/trabalhos/trabalho_1041273700.htm) Acesso em: 28 de jul. de 2021.

LEE, S. S.; ROBINSON, F.M.; WONG, H.Y. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology Bioengineering Symposium**, [s. l.], n. 11, 1981.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, p. 839, 2000.

LÉVÊQUE, E.; JANEČEK, Š.; HAYE, B. BELARBIB, A. Thermophilic archaeal amylolytic enzymes. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v.26, n.1, p. 3-14, 2000.

LIMA, U. A.; BASSO, L. C.; AMORIN, H. V. Produção de etanol. In: LIMA, U.A. **Biotecnologia**. São Paulo: E. Blucher, v. 3, n. 1, p. 1-43, 2001.

LNF. **Açúcar e etanol**, 2021. Disponível em: <https://lnf.com.br/> Acesso em: 04 jul. 2021.

MAAREL, M. J. E. C. Properties and Applications of Starch-converting Enzymes of the  $\alpha$ -amylase family. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 94, p. 137-155, 2002.

MANTOVANI, E.C. **Colheita mecanizada de milho. Colheita mecânica, secagem e armazenamento do milho**. Campinas - SP: Fundação Cargill, p. 35, 1989.

MAY, L. **Biotecnologia**, Faculdade Estácio de Sá de Campo Grande/MS. Curso de farmácia – Biotecnologia. 2008. Disponível em: < [www.fes.br/disciplinas/far/biotecnologia/10%AA-AULABiotec-2008.ppt](http://www.fes.br/disciplinas/far/biotecnologia/10%AA-AULABiotec-2008.ppt) >. Acesso em: 09 de jun. de 2021.

MDC - Mapa da cachaça. **A fermentação da cachaça de alambique**, 2019. Disponível em: < <https://www.mapadacachaca.com.br/artigos/a-fermentacao-da-cachaca-de-alambique/> >. Acesso em: 05 de agosto de 2021.

MOULIN, G.; BOZE, H.; GALZY, P. Inhibition of alcoholic fermentation. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, **Andover**, [s. l.], v. 2, p. 365-382, 1984.

NOGUEIRA, L. C.; ALCANTARA, G. U.; MOYA, S. M.; COSTA, G. H. G. **Extração de açúcares do grão de milho de 1,18mm em diferentes tempos de cozimento**. p. 1162-1166.

In: Anais do XII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica - **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, São Paulo, v. 1, n.4. 2017.

OBEL, L. B. Putting enzymes to work in bakery applications. **Cereal Foods World**, [s. l.], v. 46, n. 9, p. 396-399, 2001.

PAES, M. C. D. **Aspectos Físicos, Químicos e Tecnológicos do Grão de Milho**. Embrapa Milho e Sorgo. Circular Técnica, n. 75. Sete Lagoas, p. 6. 2006.

PAYNE, J. H. **Operações unitárias na produção de açúcar de cana**. 2ª edição. São Paulo: Nobel: STAB, 2010.

PEREIRA, F. B.; GUIMARÃES, P. M. R.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L.; Selection of *Saccharomyces cerevisiae* strains for efficient very high gravity bio-ethanol fermentation processes. **Biotechnology Letters**, Kew, v. 32, p. 1655-1661, 2010.

REIN, P. **Engenharia do Açúcar de Cana**. Edição em Português. Editora Bartens, 2013. 608 p.

SANTIN, A. P. **Estudo da secagem e na inativação de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*)**, 1996. Disponível em: < <https://core.ac.uk/> >. Acesso em: 09 de agosto de 2021.

SHARIFFA, Y. N.; KARIM, A. A.; FAZILAH, A. ZAIDUL, I. S. M. Enzymatic hydrolysis of granular native and mildly heat-treated tapioca and sweet potato starches at sub-gelatinization temperature. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 2, p. 434-440, 2009.

SINGH, N.; SINGH, J.; KAUR, L.; SINGH SODHI, N.; SINGH GILL, B. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, [s. l.], v.81, n.2, p. 219-231. 2003.

SRICHUWONG, S.; GUTESA, J.; BLANCO, M.; DUVICK, S. A.; GARDNER, C.; JANE, J.L. Characterization of Corn Grains for Dry-Grind Ethanol Production. **Journal of ASTM International**, [s. l.], v.7, n.2. 2010.

STEINDL, R. J. Clarification of cane juice for fermentation. **Proceedings of International Society of Sugar Cane Technology**. Austrália, v. 27, p. 1-10, 2010.

STUPIELLO, J. P.; HORI, J. Condução da fermentação alcoólica. **Saccharum**, [s. l.], v. 17, p. 43-46, 1981.

SUVD, D. FUJIMOTO, Z.; TAKASE, K.; MATSUMURA, M.; MIZUNO, H. Crystal structure of *Bacillus stearothermophilus* alpha-amylase: possible factors determining the thermostability. **Journal of Biochemistry**, [s. l.], v.129, p.461-468, 2001.

TORRES, L. M.; LEONEL, M.; MISCHAN, M. M. Amylolitic enzymes concentration in the starch hydrolysis of ginger. **Ciência Rural**, [s. l.], v. 42, n. 7. 2012.

VENTURINI FILHO, W.G; BRUNELLI L.; TONIAT, O. J; NOJIMOTO T.; NOVAES, F. V. Método simples para quantificar o metabolismo aeróbio e anaeróbio de levedura alcoólica. **Boletim do Centro de Processamento de Alimentos**, [s. l.], v. 31, n. 2, 2013.

WALKER, G. M. **Yeast Physiology and Biotechnology**: Wiley. 1. ed. 1998.

## CAPITULO 3 - PRODUÇÃO DE ETANOL É INFLUENCIADA POR DIFERENTES HÍBRIDOS DE MILHO

### RESUMO

A produção de etanol milho pode ser influenciada de acordo com o híbrido utilizado no processamento. Uma vez que há híbridos que tem maior produtividade de grãos em seu cultivo e que outros possui maior eficiência industrial/fermentativa. Portanto o objetivo do trabalho foi avaliar os reflexos do processamento de três híbridos de milho na produção de etanol. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os híbridos utilizados foram milho da Dekalb 636, Pioneer 3754 e Syngenta 8454, os mesmos foram triturados e imersos em água acidulada com adição da enzima  $\alpha$ -amilase, em seguida, o material foi aquecido a 100° C por 1 hora. As pastas foram resfriadas a temperatura ambiente, filtradas em peneira de 20 mashes e ajustadas o °Brix para 16° e o pH para 4,5, originando o mosto. Os mostos foram inoculados com a levedura industrial TR (Thermo-Resistente da LNF) com a adição da enzima glucoamilase. As fermentações foram mantidas em B.O.D. a 33°C. Ao longo do processo fermentativo foi avaliado o desenvolvimento fisiológico da levedura, as pastas, mostos e vinhos foram avaliados químico tecnologicamente. Após este procedimento, observou-se que o processo de cozimento e hidrólise resultou em pasta com teor de °Brix similares para os híbridos Dekalb e Syngenta. A pasta do híbrido Syngenta apresentou valor de 14,6% de Açúcares Redutores Totais, o dobro de ácidos orgânicos e maior teor de amido na pasta. Quanto a fisiologia da levedura em relação aos três híbridos de milho, não houve diferença significativa no início e nem do final da fermentação. O teor alcoólico e o glicerol obtidos pela fermentação de mostos de diferentes híbridos de milho, verificou-se que não houve diferença significativa entre esses parâmetros. Dessa forma, conclui-se que a produção de etanol é influenciada pelos grãos de híbridos de milho processados, sendo o maior impacto ocorrendo no processo de hidrólise e para os três híbridos avaliados, não afetaram a levedura na fermentação e no teor de alcoólico.

**Palavras-chave:** Bioenergia. Fermentação. Hidrólise enzimática. *Saccharomyces cerevisiae*. *Zea mays*.

## ETHANOL PRODUCTION IS INFLUENCED BY DIFFERENT CORN HYBRIDS

### ABSTRACT

The production of ethanol corn can be influenced according to the hybrid used in the processing. Since there are hybrids that have higher grain productivity in their cultivation and others have higher industrial/fermentation efficiency. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effects of the processing of three corn hybrids in the production of ethanol. The experimental design was entirely randomized, with four repetitions. The hybrids used were Dekalb 636, Pioneer 3754 and Syngenta 8454 corn, which were ground and immersed in acidulated water with the addition of the enzyme  $\alpha$ -amylase, then the material was heated at 100° C for 1 hour. The pastes were cooled to room temperature, filtered through a 20 meshes sieve and adjusted the °Brix to 16° and the pH to 4.5, originating the must. The musts were inoculated with industrial yeast TR (Thermo-Resistant from LNF) with the addition of the enzyme glucoamylase. Fermentations were maintained in B.O.D. at 33°C. Throughout the fermentative process the physiological development of the yeast was evaluated, the pastes, musts and wines were evaluated chemically technologically. After this procedure, it was observed that the cooking and hydrolysis process resulted in pulp with similar °Brix content for Dekalb and Syngenta hybrids. The Syngenta hybrid pulp showed a value of 14.6% of Total Reducing Sugars, twice as much organic acids, and higher starch content in the pulp. As for the physiology of the yeast in relation to the three corn hybrids, there was no significant difference at the beginning and at the end of the fermentation. The alcohol content and glycerol obtained by fermenting musts of different corn hybrids, it was verified that there was no significant difference between these parameters. Thus, it can be concluded that the ethanol production is influenced by the grains of corn hybrids processed, with the greatest impact occurring in the hydrolysis process and for the three hybrids evaluated, they did not affect the yeast in the fermentation and in the alcoholic content.

**Keywords:** Bioenergy. Enzymatic hydrolysis. Fermentation. *Saccharomyces Cerevisiae*. *Zea mays*.

## 1. INTRODUÇÃO

O processamento do milho no Brasil para produção de etanol, tem ocorrido em usinas dedicadas, podendo incluir etapas para obtenção de óleo, xarope e DDG (*dried distillers grains*); ou ainda em plantas anexas às usinas canavieira, sendo essas operadas na entressafra da cana-de-açúcar, em plantas denominadas “Usinas Flex” (DONKE et al. 2016).

Esse processo, vêm crescendo ano a ano, sendo que na safra 2020/2021 foram produzidos 2,7 bilhões de litros, e a estimativa para a safra 2021/2022 é de 3,5 bilhões de litros (CONAB, 2021). A estimativa é que a produção quintuple até 2030, em decorrência de legislação ambiental vigente no Brasil, denominada RENOVABIO, que incentiva a bioenergia (CONAB, 2021).

Entretanto, os grãos de milho utilizados para produção de etanol provêm das cultivares/variedades/híbridos historicamente cultivados no Brasil destinados à alimentação animal. Sendo assim, as principais características observadas pelo produtor incluem somente aspectos agronômicos, ou seja, em materiais com o ciclo produtivo compatível com o manejo de corte da planta para ensilar e em produtividade sacas/hectares (sc/ha), não considerando as características dos grãos que podem afetar o processamento industrial para produção de etanol (VIANNA et. al. 2008; JÚNIOR, 2016).

Sendo assim, com esta vasta área de híbridos, cabe estudar quais são os mais adequados para produção de etanol, pois, estudos demonstram que há híbridos que tem maior produtividade de grãos em seu cultivo e que outros possui maior eficiência fermentativa aumentando a quantidade de etanol produzida por tonelada de milho processada (LOZANO et. al. 2020).

Além disso, decorrente das características dos grãos de milho, pode ter cultivares que possuem compostos que prejudicam a ação da enzima (ácidos, fenóis, diferença de pH) no processo de hidrólise enzimática, bem como inibir a fermentação com quantidades elevadas de ácidos e fenóis (MESSIAS et. al. 2016).

Portanto, neste projeto foi escolhido três híbridos decorrente da disponibilidade da região de Frutal-MG, Brasil, sendo o híbrido Dekalb 636, é o mais cultivado na região devido ao seu desempenho agronômico (sacas/hectare), o híbrido Pioneer 3754 com desempenho similar ao Deklab e o da Syngenta 8454 um novo híbrido no mercado regional.

Dessa forma, o objetivo do trabalho foi avaliar os reflexos do processamento de três híbridos de milho na produção de etanol.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Ciências Ambientais da Universidade do Estado de Minas Gerais, localizada no município de Frutal-MG, Brasil. Os grãos de milho foram obtidos em unidade produtora de Planura-MG (Longitude 20°02'19.8"S e Latitude 48°39'15.9"W), os quais foram colhidos mecanicamente no dia 08 de agosto de 2019, quando apresentavam entre 120 e 150 dias de cultivo.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os tratamentos foram constituídos por 3 híbridos de milho (Dekalb 636, Pioneer 3754 e Syngenta 8454), colhidos mecanicamente quando a umidade estava abaixo de 20%. A escolha dos híbridos foi em função de serem os mais plantados e cultivados nas áreas comerciais da região de Frutal-MG. Após a colheita, os grãos foram dispostos em estufa a 45° C por 10 dias, para igualar a umidade de todos em 15%.

A seguir, as amostras foram trituradas em triturador forrageiro, seguido de peneiramento até granulometria inferior a 2,00 mm. Os grãos triturados foram imersos em água acidulada (pH 5,5) na proporção de 250 g.L<sup>-1</sup>. No béquer foi dosado 0,05 mL da quantidade de enzima necessária para adiantar a “gelatinização” do amido (processo de liquefação), inibindo a solidificação da amostra, este material foi aquecido a 100° C por 1 hora, formando uma pasta. Na sequência, a pasta foi resfriada a 80-90°C e dosado 0,1mL de enzima permanecendo em agitação constante de 300 rpm. Em ambas as dosagens, foi dosado a enzima  $\alpha$ -amilase (LpHera® Novozymes) na proporção de 300 KNU.g<sup>-1</sup> de amido, a fim de hidrolisar esse composto em moléculas de glicose (BOTHAST; SCHLICHER, 2004; LNF, 2021; NOGUEIRA et al. 2017).

As pastas foram resfriadas a temperatura ambiente e filtradas em peneira de 20 meshes (Figura 1). O °Brix foi quantificado e ajustado para 16° Brix com água destilada, já o pH foi ajustado para 4,5 utilizando ácido sulfúrico 10N, originando o mosto.



**Figura 1** – Filtração da pasta após hidrólise

Os mostos foram inoculados com a levedura industrial TR (Thermo-Resistente da LNF) utilizada propriamente para fermentação de mostos de milho, na concentração de 10% do volume a ser fermentado (400 mL de mosto para 40 g de levedura) com a adição de 0,2 mL da enzima glucoamilase (AML 300L Novozymes) para sacarificar a amostra. As fermentações foram mantidas em B.O.D. (Biochemical oxygen demand) a 33°C (LNF, 2021).

Ao longo do processo fermentativo foi avaliado o desenvolvimento fisiológico da levedura, através de análises microscópicas propostas por Lee et al. (1981), sendo estas: viabilidade celular, brotamento e viabilidade de brotos.

Concluído o processo fermentativo (Brix menor ou igual a 1, ou estabilização na leitura de Brix em intervalo de 1 hora), foi realizada a centrifugação do material fermentado, a fim de se separar as leveduras do vinho.

Na pasta e no mosto, foram avaliados os seguintes parâmetros: °Brix, Açúcares Redutores Totais (ART), pH, Acidez Total (CTC, 2005), Compostos Fenólicos Totais (FOLIN; CIOCALTEU, 1927) e Amido (CHAVAN et al. 1991). Para o vinho, avaliou-se o °Brix, Açúcares Redutores Residuais Totais (ARRT), pH, Acidez Total, Amido, Glicerol e Teor Alcoólico (CTC, 2005).

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância pelo teste F, e as médias comparadas segundo teste de Tukey (5%), utilizando-se o programa AGROESTAT® (BARBOSA; MALDONADO, 2015).

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Tabela 1 estão apresentados os valores médios obtidos para °Brix, Açúcares Redutores Totais (ART), pH, Acidez Total, Compostos Fenólicos e Amido da pasta de milho obtidos de três híbridos de milho.

Observou-se que o processo de cozimento e hidrólise resultou em °Brix similares para os híbridos Dekalb e Syngenta, da ordem de 19%. Entretanto, deve-se destacar que embora o híbrido Dekalb tenha tido elevado teor de sólidos solúveis, apenas 58% desses sólidos eram compostos por glicose, frutose ou sacarose, ao contrário do Syngenta que a proporção é de 75%. Neste sentido, deve-se destacar ainda que os procedimentos adotados apenas extraíram 16% de °Brix, que continha 57% de açúcares em sua constituição. Esse fator pode estar relacionado a quantidade de amido no grão, ou ainda, a enzima que pode apresentar comportamento diferente decorrente aos vários tipos de híbridos de milho, mas para afirmar esta tese é necessários outros estudos. Esses valores diferiram dos obtidos por Lozano et al. (2020), que observaram que três híbridos Dow obtiveram 13% de °Brix com teores de açúcares acima de 95% do total de sólidos. Entretanto, deve-se destacar que o °Brix e o ART do híbrido Dekalb foram maiores que os determinados pelos autores.

**Tabela 1** – Valores médios obtidos para °Brix, Açúcares Redutores Totais (ART), pH, Acidez Total, Compostos Fenólicos Totais e Amido da pasta de milho obtido de três híbridos

Híbridos	°Brix (%)	ART (%)	pH	Acidez Total (g.L <sup>-1</sup> )	Compostos Fenólicos (mg.L <sup>-1</sup> )	Amido (%)
<b>Dekalb</b>	19,6A	11,4B	5,8A	0,62B	336A	0,33B
<b>Pioneer</b>	16,6B	9,5C	5,6B	0,62B	249B	0,27B
<b>Syngenta</b>	19,4A	14,6A	5,6B	1,26A	324A	0,45A
<b>DMS</b>	0,01	0,1	0,03	0,08	0,07	0,01
<b>CV</b>	0,46	2,07	0,75	13,92	1,03	1,00
<b>Teste F</b>	10,24**	70,51**	21,27**	462,88**	11,53**	62,86**

Legenda: Letras diferem na coluna segundo teste de Tukey (5%). %. \*\*significativo ao nível de 1% de probabilidade. DMS – Desvio mínimo significativo. CV – Coeficiente de Variação.

Importante observar que além de ART, o híbrido Syngenta também extraiu o dobro de ácidos dos grãos. Esse parâmetro é importante se determinar pois elevados valores podem afetar a fisiologia da levedura durante o processo fermentativo, podendo resultar em morte celular (WALKER, 1998). Também foram determinadas diferenças para o pH, que foi superior para o DKL. Esses teores foram dentro do esperado, uma vez que a água utilizada para extração apresentava pH de 5,5.

Nesse mesmo contexto, o cozimento e hidrólise dos grãos Syngenta também resultaram em maior teor de amido na pasta em relação aos demais. Embora tenha sobrado amido após o cozimento, pode-se inferir que essas moléculas são maltodextranses que não são quebradas pela enzima alfa amilase (JACQUES et. al. 1999). Esse processo de conversão deverá ocorrer somente durante a fermentação quando será inserido a enzima amiloglicosidase. Entretanto, interessante constatar que híbridos diferem no teor de açúcares do seu grão.

Para os compostos fenólicos, o híbrido da Pioneer apresentou valor inferior a  $300 \text{ mg.L}^{-1}$ , enquanto os híbridos Dekalb e Syngenta apresentaram teores entre 320 e  $340 \text{ mg.L}^{-1}$ . O experimento constata que os grãos de milho apresentam fenóis em sua constituição. Entretanto, deve-se destacar que os teores são inferiores aos observados para o caldo de cana por Costa et al. (2016), que determinaram teores da ordem de  $406 \text{ mg.L}^{-1}$  para caldo da variedade de cana CTC5. Cabe ressaltar que valores acima de  $300 \text{ mg.L}^{-1}$  interferem na fisiologia da levedura durante o processo de fermentação (MESSIAS et. al. 2016).

Na Tabela 2 estão apresentados os valores obtidos para Acidez Total, Compostos Fenólicos e Amido do mosto de milho obtidos de três híbridos de milho. Deve-se destacar que o °Brix e o pH foram ajustados para 16° e 4,5 respectivamente para todos os tratamentos.

Observou-se que o comportamento desses compostos foi similar aos já observados na pasta, com maiores teores de acidez e amido para o híbrido Syngenta em relação aos demais, já os compostos fenólicos se mantiveram em valores abaixo de  $300 \text{ mg.L}^{-1}$ , lembrando que valores superiores podem afetar o processo de fermentação (MESSIAS et al., 2016).

**Tabela 2** – Valores obtidos para Acidez Total, Compostos Fenólicos Totais e Amido do mosto de milho obtido de três híbridos

<b>Híbridos</b>	<b>Acidez Total (g.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Compostos Fenólicos (mg.L<sup>-1</sup>)</b>	<b>Amido (%)</b>
<b>Dekalb</b>	0,86	253	0,21
<b>Pioneer</b>	1,10	248	0,26
<b>Syngenta</b>	1,23	247	0,40

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nas Tabelas 3 estão apresentados os valores médios para viabilidade celular, Índice de Brotamentos e Viabilidade de Brotos da levedura Thermo-Resistente (TR), no início e final da fermentação do mosto de milho obtido de três híbridos.

Observando-se a viabilidade celular no início e final da fermentação, os valores médios para os três híbridos foram superiores a 92,5%. Esses valores foram superiores ao encontrado por Mutton et. al. (2017) em mosto de caldo de cana. Esses resultados são importantes, pois Amorim et al. (1996) afirmam que para a fábrica possuir rendimentos elevados é necessário que a quantidade de células vivas seja superior a 85%.

Para o índice de brotamento, no início e do final da fermentação, os valores foram de 7,9 a 12,1,% para os três híbridos, se enquadrando aos de Amorim et al. (1996), que a fermentação etanólica deve apresentar valores de índice de brotamento entre 3 a 16%, para haver renovação de células novas dentro das dornas de fermentação.

Avaliando os valores médios para a viabilidade de brotos, no início e no final da fermentação, se mantiveram acima de 93,8%.

De modo geral, analisando estes parâmetros não houve diferença significativa no início e nem do final da fermentação em mosto de milho para os três híbridos. Esse comportamento também foi obtido por Lozano et al. (2020), que estudando a fermentação de diferentes híbridos Dow, verificou dados elevados para todos os parâmetros. Entretanto, os autores trabalharam com a levedura BG-1, recomendada para caldo de cana-de-açúcar.

**Tabela 3** – Valores médios obtidos para Viabilidade Celular, Índice de Brotamentos Viabilidade de Brotos da levedura TR, no início e final da fermentação do mosto de milho obtido de três híbridos

Híbridos	Viabilidade Celular (%)		Brotamentos (%)		Viabilidade de Brotos (%)	
	Início	Final	Início	Final	Início	Final
<b>Dekalb</b>	95,2	92,5	9,4	9,4	100	95
<b>Pioneer</b>	96,5	95,2	12,1	11,9	97,5	93,8
<b>Syngenta</b>	94,7	94,1	7,9	11,8	97,5	100
<b>DMS</b>	0,06	0,63	0,21	0,01	72	11
<b>CV</b>	0,69	1,73	7,6	1,15	11,58	19,71
<b>Teste F</b>	0,38ns	0,90ns	1,75ns	0,51ns	0,50ns	0,91ns

Legenda: Letras na coluna diferem de acordo com teste de Tukey (5%). %. \*\*significativo ao nível de 1% de probabilidade. DMS – Desvio mínimo significativo. CV – Coeficiente de variação. ns – não significativo.

Na Tabela 4 estão apresentados os valores médios para °Brix, Açúcares Redutores Residuais Totais (ARRT), pH, Acidez Total e Teor de Amido do vinho obtido através da fermentação de mosto de milho obtido de três híbridos.

Considerando-se o °Brix os valores foram de 0% para os três híbridos. Deve-se destacar que a levedura assimilou todos os açúcares presente no mosto.

Comportamento similar foi determinado para a análise de açúcares redutores residuais totais (ARRT), que indicou que os sólidos solúveis presentes no mosto foram assimilados pela levedura Thermo-Resistente eram açúcares.

Porém deve-se destacar que o °Brix e o ARRT encontrados foram similares aos obtidos em fermentação de caldo de cana, uma vez que Montijo et al. (2014), Macri et al. (2014) e Masson et al. (2015) determinaram °Brix inferior a 1% e ARRT variando entre 0,1 e 0,4%.

Considerando-se o pH e a Acidez Total, observaram-se diferenças para todos os parâmetros avaliados. O híbrido Dekalb foi o que mais utilizou açúcares para a formação de ácidos orgânicos, enquanto o híbrido da Syngenta resultou num vinho mais ácido decorrente da análise da acidez total. Cabe destacar que os valores determinados também foram similares aos obtidos em fermentação de caldo de cana (MONTIJO et al. 2014).

Observando-se os teores de amido, para os três híbridos avaliados, os valores médios foram praticamente nulos, o que significa que a enzima aplicada no experimento hidrolisou

todas as moléculas de amido presente no mosto, cabe ressaltar que para o híbrido Dekalb e Syngenta ambas não apresentaram diferença significativa.

**Tabela 4** – Valores médios obtidos para Brix, Açúcares Redutores Residuais Totais (ARRT), pH, Acidez Total e Amido do vinho obtido da fermentação de mosto obtido de três híbridos de milho

Híbridos	°Brix (%)	ARRT (%)	pH	Acidez Total (g.L <sup>-1</sup> )	Amido (%)
<b>Dekalb</b>	0	0,22B	3,0C	4,04B	0,004B
<b>Pioneer</b>	0	0,32A	3,6A	3,86C	0,009A
<b>Syngenta</b>	0	0,12C	3,3B	4,98A	0,005B
<b>DMS</b>	-	28,66	0,02	0,01	256,27
<b>CV</b>	-	24,25	1,10	0,96	5,85
<b>Teste F</b>	-	66,94**	148,27**	143,42**	8,42**

Legenda: Letras na coluna diferem de acordo com teste de Tukey (5%). %. \*\*significativo ao nível de 1% de probabilidade. DMS – Desvio mínimo significativo. CV – Coeficiente de variação.

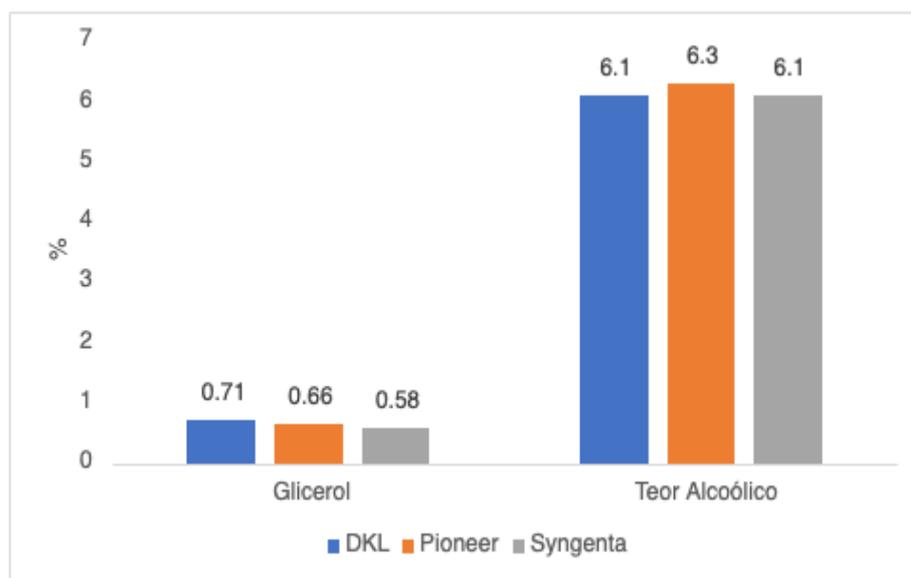
Considerando o teor alcoólico e o glicerol obtidos pela fermentação de mostos de diferentes híbridos de milho, verificou-se que não houve diferença significativa entre esses parâmetros (Figura 1). Esse comportamento é importante, pois demonstra que os híbridos avaliados não influenciaram sobre o desempenho fermentativo da levedura TR.

Esse comportamento também já havia sido detectado por Lozano et al. (2020), de modo que esse trabalho corrobora com a tese de que o desempenho agrônômico do híbrido pode ser considerado decorrente da sua produtividade no campo, uma vez que o processamento industrial não foi afetado.

Outro ponto a se destacar são os valores determinados para esses dois índices, que foram similares aos obtidos em fermentações utilizando caldo de cana. Mutton et. al., (2019) demonstraram que fermentações industriais de caldo de cana podem resultar em em vinhos com teores alcoólicos de 6 a 7%, e concentração de glicerol de 0,35 à 0,4%.

Os autores indicam ainda que a produção de glicerol pela levedura consome açúcares do mosto que poderiam ser direcionados para a produção de etanol. Entretanto, esse processo ocorre com o intuito de regeneração do NAD durante a assimilação de açúcares, possibilitando a produção de ATP durante a fermentação. Nesse processo, deve-se destacar ainda que

situações específicas do substrato podem induzir aumento da produção de glicerol, tais como velocidade de alimentação da dorna (MUTTON et al., 2019), microrganismos contaminantes (CAMOLEZ; MUTTON, 2004) e excesso de sais inorgânicos no meio (WALKER, 1998).



**Figura 2** – Valores médios obtidos para teor alcoólico e glicerol (%) dos vinhos obtidos de diferentes híbridos de milho. Teste F não significativo

#### 4. CONCLUSÃO

Conclui-se que a produção de etanol é influenciada pelos grãos de híbridos de milho processados, sendo o maior impacto ocorrendo no processo de hidrólise. No presente estudo, o processamento do híbrido Syngenta 8454 resulta em maior teor de açúcar na pasta, e para os três híbridos avaliados, não afetaram a levedura na fermentação e no teor alcoólico.

#### REFERÊNCIAS

AMORIM, H.V.; BASSO, L.C.; ALVES, D.G. **Processos de produção de álcool**: Controle e monitoramento. Piracicaba: FERMENTEC/FEALQ/ESALQ-USP, p. 93, 1996.

BARBOSA, J. C.; MALDONADO JUNIOR, W. **Experimentação Agronômica & AgroEstat**: Sistema para Análises Estatísticas de Ensaios Agronômicos. FUNEP: Jaboticabal, 2015.

BOTHAST, R. J.; SCHLICHER, M.A. Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, n. 1, 2004.

CAMOLEZ, M. A.; MUTTON, M. J. R. **Influência de microrganismos contaminantes sobre o processo fermentativo**. STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos, v. 23, n. 5, p. 6-9, 2004.

CHAVAN, S. M.; KUMAR, A.; JADHAV, S. J. Rapid quantitative analysis of starch in sugarcane juice. **International Sugar Journal**, Glamorgan, v. 93, n. 107, 1991.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira: Cana-de-açúcar, maio 2021** – Safra 2021/2022. v. 8, n. 3. Brasília p. 1-56.

COSTA, G. H. G.; FREITA, C. M.; MENDES, F. Q.; MUTTON, M.J.R. Extract of moringa seeds as sugarcane juice flocculant. **Revista Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 10, 2016.

CTC . Centro de Tecnologia Canavieira. **Manual de métodos de análises para açúcar**. Piracicaba, Centro de Tecnologia Canavieira, Laboratório de análises, 2005. Disponível em CD ROM.

DONKE, A. C. G.; VIÑAS, R.; MATSUURA, M. I. da S. F.; MATAI, P. H. L. S.; KULAY, L. A. **Usina Flex: comparação dos desempenhos ambiental e energético do etanol de cana-de-açúcar, milho e sorgo**. V CONGRESSO BRASILEIRO EM GESTÃO DO CICLO DA VIDA. Fortaleza, CE. 2016.

FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **The journal of biological chemistry**, Bethesda, v. 73, n. 2, p. 627-50, 1927.

JACQUES, K.; LYONS, T.P.; KELSALL, D.R. **The alcohol textbook**. 3. ed. Nottingham: Nottingham Press, p. 386, 1999.

JÚNIOR, G. S. D. **Seis pontos importantes na escolha de híbridos de milho para silagem**, 2016. Disponível em: <https://www.revistaleiteintegral.com.br/noticia/seis-pontos-importantes-na-escolha-de-hibridos-de-milho-para-silagem> Acesso em: 28 de jun. de 2021.

LEE, S.S.; ROBINSON, F.M.; WONG, H.Y. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology Bioengineering Symposium**, n. 11, 1981.

LNF. **Açúcar e etanol**, 2021. Disponível em: <https://lnf.com.br/> Acesso em: 04 jul. 2021.

LOZANO, E. V.; ALCANTARA, G. U.; MOYA, S. M.; CIARAMELLO, S.; COSTA, G. H.G. Produção de Etanol a partir de diferentes híbridos de milho, 2017. **Revista brasileira de engenharia de biosistemas**. São Paulo: Tupã. v. 11, n. 3, 2020.

MACRI, R.C.V.; COSTA, G.H.G.; MONTIJO, N.A.; SILVA, A.F.; MUTTON, M.J.R. Moringa extracts used in sugarcane juice treatment and effects on ethanolic fermentation. **African Journal of Biotechnology**, v.13, n.42, 2014.

MASSON, I.S.; COSTA, G.H.G.; ROVIERO, J.P.; FREITA, L.A.; MUTTON, M. A.; MUTTON, M.J.R.; Produção de bioetanol a partir da fermentação de caldo de sorgo sacarino e cana-de-açúcar. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 9, p.1695-1700, set, 2015.

MESSIAS, R.C.; NOGUEIRA, L.C., COSTA, G.H.G.; Compostos fenólicos afetam a levedura durante o processo fermentativo. **Ciência & Tecnologia: FATEC-JB**, Jaboticabal, v. 8, Número especial, 2016.

MONTIJO, N.A.; SILVA, A.F. COSTA, G.H.G.; FERREIRA, O.E.; MUTTON, M.J.R. Yeast CA-11 fermentation in musts treated with brown and green propolis. **African Journal of Microbiology Research**, v.8, n.39, 2014.

MUTTON, M. J. R.; FERRARI, F. C.; FREITA, L. A.; FREITA, C. M.; ANDRIETTA, M. G. S.; ANDRIETTA, S. R. Interaction between the production of ethanol and glycerol in fed-batch bioreactors. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 389-394, 2019.

MUTTON, M. J. R.; FREITAS, C. M.; TRALLI, L. F.; SILVA, A.; MENDES, F. Q.; TEIXEIRA, V. Bioethanol production with different dosages of the commercial Acrylamide polymer compared to a Bioextract in clarifying sugarcane juice. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 4, pag. 3093-3102, 2017.

NOGUEIRA, L. C.; ALCANTARA, G. U.; MOYA, S. M.; COSTA, G. H. G. **Extração de açúcares do grão de milho de 1,18mm em diferentes tempos de cozimento**. p. 1162-1166. In: Anais do XII CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA - Blucher Chemical Engineering Proceedings, v. 1, n.4. São Paulo: Blucher, 2017.

VIANNA, R. T.; GAMA, E. E. G.; NASPOLINI FILHO, V. **Cultivares de milho para o Brasil**, 2008. Embrapa: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Disponível em: <https://www.embrapa.br/> Acesso em: 19 jun. 2021.

WALKER, G. M. **Yeast Physiology and Biotechnology**: Wiley. 1. ed. 1998.

## CAPÍTULO 4 – TEMPO E TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO DOS GRÃOS DE MILHO AFETAM AS CARACTERÍSTICAS DA PASTA PARA PRODUÇÃO DE ETANOL

### RESUMO

No Brasil, há poucas informações referente aos impactos que podem ser causados na produção de etanol de milho devido ao período e temperatura de armazenamento dos grãos de milho. Pois, o armazenamento está diretamente relacionado com a qualidade dos grãos e a temperatura é um dos principais fatores que interferem durante o armazenamento, acelerando as reações bioquímicas e metabólicas dos grãos. Desta maneira, o objetivo do trabalho foi avaliar o tempo e a temperatura de armazenamento de grãos de milho sobre as características da pasta, e sobre o processo fermentativo para produção de etanol. O delineamento experimental foi em parcelas subdivididas, com quatro repetições. Os tratamentos principais foram por 5 tempos de armazenamento e os tratamentos secundários foram compostos por 3 temperaturas de armazenamento. Para cada época avaliada, os grãos foram triturados, peneirados e imersos em água acidulada. O material foi aquecido a 100°C por 1 hora, nesta etapa foi dosado enzima  $\alpha$ -amilase. As pastas foram resfriadas a temperatura ambiente, filtradas em peneira e ajustado o °Brix para 16° e o pH para 4,5. Essas foram submetidas a inoculação pela levedura Thermo-resistente (LNF), onde adicionou-se enzima glucoamilase. As fermentações foram mantidas em B.O.D. a 33°C e no final da fermentação, realizou-se processo de centrifugação para recuperação da levedura e separação vinho. Ao longo do processo fermentativo foi avaliado a viabilidade celular, brotamento e viabilidade de brotos da levedura, as pastas, mostos e vinhos foram avaliados quimico tecnologicamente. Considerando as pastas obtidas, observou-se que a temperatura de armazenamento dos grãos não influenciou o teor de °Brix. Esses resultados são importantes, pois demonstram que o teor de carboidratos não foi afetado negativamente pelas condições de armazenamento dos grãos. Considerando os aspectos microbiológicos durante o processo fermentativo, verificou-se que não houveram diferenças significativas entre os tratamentos estudados. E a temperatura de armazenamento, de modo geral, não foi observado diferenças entre os tratamentos. Sendo assim, conclui-se que as temperaturas de armazenamento dos grãos de milho não influenciam sobre a fisiologia da levedura e o tempo de armazenamento por mais de 90 dias diminui significativamente o teor alcoólico do vinho.

**Palavras-chave:** Biocombustíveis. Bioenergia. Processo fermentativo. *Zea mays*.

## CORN GRAIN STORAGE TIME AND TEMPERATURE AFFECT PASTE CHARACTERISTICS FOR ETHANOL PRODUCTION

### ABSTRACT

In Brazil, there is little information regarding the impacts that can be caused in the production of corn ethanol due to the storage period and temperature of corn grains. Because storage is directly related to the quality of grains and temperature is one of the main factors that interfere during storage, accelerating the biochemical and metabolic reactions of grains. Thus, the objective of this study was to evaluate the time and temperature of corn grain storage on the characteristics of the paste, and on the fermentative process for ethanol production. The experimental design was in subdivided plots, with four repetitions. The main treatments were for 5 storage times and the secondary treatments were composed of 3 storage temperatures. For each time period evaluated, the grains were crushed, sieved, and immersed in acidulated water. The material was heated at 100°C for 1 hour, at this stage  $\alpha$ -amylase enzyme was dosed. The pastes were cooled to room temperature, filtered through a sieve, and the °Brix was adjusted to 16° and the pH to 4.5. These were subjected to inoculation by Thermo-resistant yeast (LNF), where glucoamylase enzyme was added. The fermentations were kept in B.O.D. at 33°C and at the end of the fermentation, a centrifugation process was performed for yeast recovery and wine separation. Throughout the fermentative process, cell viability, budding and bud viability of the yeast were evaluated, the pastes, musts and wines were chemically and technologically evaluated. Considering the pastes obtained, it was observed that the storage temperature of the grains did not influence the °Brix content. These results are important, because they demonstrate that the carbohydrate content was not negatively affected by the storage conditions of the grains. Considering the microbiological aspects during the fermentation process, it was verified that there were no significant differences among the treatments studied. And the storage temperature, in general, was not different among the treatments. Therefore, it can be concluded that the storage temperatures of corn grains do not influence the yeast physiology and the storage time for more than 90 days significantly decreases the alcohol content of the wine.

**Key words:** Biofuels. Bioenergy. Fermentative process. *Zea mays*.

## 1. INTRODUÇÃO

O etanol é um dos biocombustíveis mais utilizados atualmente em substituição a combustíveis fósseis em veículos automotores leves. Sua utilização pode ser decorrente da queima direta nos motores, ou ainda a partir da mistura com a gasolina, resultando no aumento de octanagem da mesma e, ao mesmo tempo, diminuindo o consumo de gasolina. Países como China, União Europeia, Colômbia, Japão e Angola já apresentam mistura de 10% de etanol à gasolina, enquanto o Brasil a mistura está na faixa de 25% (LANE, 2018).

A produção de etanol pode ser a partir de matérias-primas açucaradas, tais como o caldo da cana-de-açúcar, beterraba açucareira, milho, mandioca e sorgo. O milho é uma das culturas mais utilizada para essa finalidade, sendo os Estados Unidos o principal produtor de etanol a partir dessa cultura, com produção em 2018 da ordem de 60,5 bilhões de litros (RFA, 2018).

Essa cultura vem sendo implementada em países que até então apresentavam tradição no processamento da cana-de-açúcar para produção de etanol, como é o caso do Brasil. Esse país destaca-se por ser o segundo maior produtor de etanol com 30 bilhões de litros produzidos em 2018 originados da cana-de-açúcar. Entretanto, apresenta déficit entre a produção desse biocombustível e o consumo do mesmo no mercado interno, obrigando o país a utilizar novas matérias-primas para produzir etanol, como o milho (UNICADATA, 2019).

A produção dessa matéria-prima vem sendo realizada em áreas dedicadas a apenas plantio de grãos, ou ainda em rotação a cana-de-açúcar nas áreas de renovação de canaviais (SANTOS et al. 2019). O processamento dos grãos ocorre em usinas dedicadas a produção de etanol de cereais, ou ainda em usinas denominadas “flex”, que processam cana-de-açúcar durante a safra (outono à primavera) e milho durante a entressafra (verão) (PARAGINSKI, 2014). Para que essa dinâmica ocorra, obrigatoriamente os grãos produzidos ao longo do ano têm que ser armazenados em silos ao longo do ano.

Embora esse processo vem sendo utilizado no Brasil, há poucas informações referentes aos impactos causados na fermentação decorrente do período de armazenamento dos grãos, bem como a produção de etanol em vista do clima da região de instalação das indústrias podendo ocorrer alteração no rendimento decorrente da temperatura de armazenamento dos grãos de milho.

Pois, a qualidade de armazenamento está diretamente relacionada com a qualidade inicial dos grãos, no entanto durante o período de armazenamento os grãos são influenciados por fatores como temperatura, umidade dos grãos, umidade relativa do ar, atmosfera de armazenamento, presença de micro-organismos, insetos, ácaros e tempo de armazenamento, fatores esses que podem influenciar negativamente no rendimento da produção de etanol (REED et al., 2007; PARK et al., 2012; PARAGINSKI et al., 2014).

A temperatura é um dos principais fatores que interferem na qualidade dos grãos durante o armazenamento, acelerando as reações bioquímicas e metabólicas dos grãos, pelas quais reservas armazenadas em seu tecido são utilizadas, dessa forma, ocorrendo diminuição de carboidratos.

O armazenamento de grãos de milho é amplamente utilizado no Brasil, pois facilita a logística de distribuição, e ainda auxilia a comercialização em épocas em que o preço da saca está favorável tanto no mercado nacional quanto internacional. Os grãos podem permanecer nos silos por mais de 360 dias (ACOSTA et al. 2016). Entretanto, esse processo considera a comercialização do milho para a indústria de ração animal ou exportação. Para a produção de etanol a partir desta matéria-prima, o tempo de armazenamento pode afetar as características químicas do grão, podendo impactar no processo de hidrólise do amido, ou ainda no processo fermentativo (ACOSTA et al. 2016; CAMARGO et al., 2014).

Essas condições podem resultar em alterações fisiológicas do milho (SBRUSSI; ZUCARELI, 2015), podendo resultar na produção de compostos que podem inibir a levedura durante o processo fermentativo (MESSIAS et al. 2016). Assim, se faz necessário o estudo de temperaturas de armazenamento dos grãos e os reflexos sobre o teor de açúcares extraídos e o desempenho da fermentação etanólica.

Desta maneira, o objetivo do trabalho foi avaliar o tempo e a temperatura de armazenamento de grãos de milho sobre as características da pasta, e sobre o processo fermentativo para produção de etanol.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Delineamento experimental**

O experimento foi instalado no Laboratório de Ciências Ambientais da Universidade do Estado de Minas Gerais, localizada no município de Frutal-MG.

O delineamento experimental foi em parcelas subdivididas, com quatro repetições. Os tratamentos principais foram representados por 5 tempos de armazenamento (30; 60; 90; 120 e 180 dias); enquanto os tratamentos secundários foram compostos por 3 temperaturas de armazenamento (25, 35 e 45°C).

### **2.2 Preparo da pasta**

Os grãos de milho foram obtidos de áreas comerciais de Frutal-MG, Brasil, originário do híbrido Dekalb 636, escolhido devido ao seu desempenho agrônomico na região em termos de produtividade, sendo colhidos mecanicamente quando a umidade estava abaixo de 20%. Após a colheita, os grãos foram dispostos em estufa de circulação a 45°C por 10 dias, para igualar a umidade de todos em 15%. Após este período as amostras foram armazenadas em ambientes de condição de temperatura controlada em 25°, 35° e 45°C, simulando um silo de armazenamento de grãos, por 30, 60, 90, 120 e 160 dias após a colheita.

Para cada época avaliada, os grãos foram triturados e peneirados até granulometria inferior a 2,00mm e imersos em água acidulada (pH 5,5) na proporção de 250 g.L<sup>-1</sup>. O material foi aquecido a 100°C por 1 hora, formando uma pasta. Nesta etapa foi dosado 0,05 mL da enzima  $\alpha$ -amilase (LpHera® Novosymes), quantidade de enzima necessária para adiantar a “gelatinização” do amido, inibindo a solidificação da pasta, na sequência, a pasta foi resfriada a 80-90°C e dosado 0,1mL de enzima, somando ambas as dosagens, a proporção foi de 300 KNU.g<sup>-1</sup> de amido, a fim de hidrolisar esse composto em moléculas de glicose (BOTHAST; SCHLICHER, 2004; LNF, 2021; NOGUEIRA et al. 2017).

Na pasta, avaliou-se o °Brix, Açúcares Redutores Totais (ART) e Amido (CHAVAN et al. 1991).

### **2.3 Preparo do mosto e fermentação**

As pastas foram resfriadas a temperatura ambiente (25°C), filtradas em peneira de 20 meshes e ajustadas a pH para 4,5 (ácido sulfúrico 10N), originando o mosto. Essas foram submetidas a inoculação pela levedura Thermo-resistente (LNF) utilizada para fermentação de mostos de milho, na proporção de 40g de levedura úmida para 400mL de mosto, Também adicionou-se 0,2 mL da enzima glucoamilase (AML 300L Novozymes). As fermentações foram mantidas em B.O.D. a 33°C (Figura 1A). Quando o °Brix foi menor ou igual à 1%, realizou-se processo de centrifugação para recuperação da levedura e reutilização no projeto e separação vinho (Figura 1B) (LNF, 2021).



**Figura 1**– Fermentação. A) B. O. D. B) – Sacarímetro (°Brix=0)

No início (40 minutos após inoculação do fermento) e final do processo fermentativo, avaliou-se a viabilidade celular, brotamento e viabilidade de brotos (LEE et al. 1981).

O vinho foi caracterizado quanto ao °Brix, Açúcares Redutores Residuais Totais (ARRT), pH, Glicerol e Teor Alcoólico (CTC, 2005).

Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância pelo teste F, e as médias comparadas segundo teste de Tukey (5%), utilizando-se o programa AGROESTAT® (BARBOSA; MALDONADO, 2015).

### 3. RESULTADOS

O primeiro passo foi caracterizar a pasta de milho obtida a partir do processamento do milho armazenado por 6 diferentes épocas, em 3 temperaturas. Para isso, avaliou-se o °Brix (Tabela 5), ART (Tabela 6) e Amido (Tabela 7) das pastas. Em aspectos gerais, verificou-se que essas variáveis não influenciaram as características da pasta.

**Tabela 1** – Interação entre tempo e temperatura de armazenamento dos grãos sobre o °Brix da pasta

Dias de Armazenamento	Temperatura de Armazenamento (°C)			P
	25	35	45	
30	21,6 Aa	19,8 Aa	20,7 Aa	0,07
60	19,6 ABa	19,0 ABa	20,4 Aa	0,20
90	20,3 Aa	20,2 Aa	19,6 ABa	0,64
120	17,7 Ba	17,8 Ba	18,0 Ba	0,90
180	20,1 Aa	21,0 Aa	20,9 Aa	0,48
<b>P</b>	0,01	0,01	0,01	

Legenda: Valores diferem de acordo com teste de Tukey (5%). Letras maiúsculas comparam coluna. Letras minúsculas comparam linhas.

**Tabela 2** – Interação entre tempo e temperatura de armazenamento dos grãos sobre os açúcares redutores totais da pasta

Dias de Armazenamento	Temperatura de Armazenamento (°C)			P
	25	35	45	
30	11,0BCa	11,7Aa	11,4BCa	0,57
60	12,0ABa	11,3Aa	11,2Ca	0,34
90	11,4Ca	12,8Aa	13,7Aa	0,01
120	11,7ABCa	11,9Aa	12,8ABa	0,10
180	13,1Aa	12,3Aa	12,0BCa	0,14
<b>P</b>	0,01	0,06	0,02	

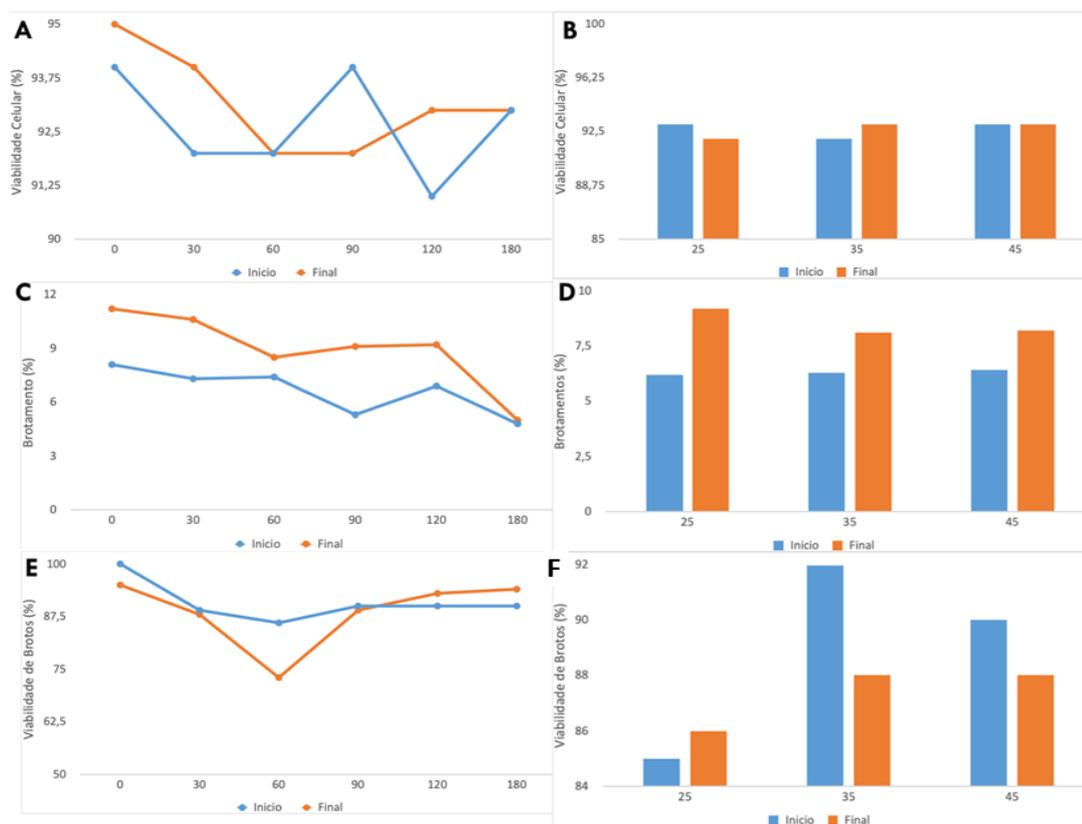
Legenda: Valores diferem de acordo com teste de Tukey (5%). Letras maiúsculas comparam coluna. Letras minúsculas comparam linhas.

**Tabela 3** – Interação entre tempo e temperatura de armazenamento dos grãos sobre o teor de amido (%) da pasta

Dias de Armazenamento	Temperatura de Armazenamento (°C)			P
	25	35	45	
<b>30</b>	0,31 Aa	0,22 Cb	0,38 Aa	0,01
<b>60</b>	0,23 Aa	0,24 ABCa	0,24 BCa	0,80
<b>90</b>	0,27 Aa	0,24 BCa	0,24 Ca	0,09
<b>120</b>	0,27 Aa	0,30 ABa	0,30 ABCa	0,65
<b>180</b>	0,29 Aa	0,33 Aa	0,35 ABa	0,49
<b>P</b>	0,21	0,01	0,01	

Legenda: Valores diferem de acordo com teste de Tukey (5%). Letras maiúsculas comparam coluna. Letras minúsculas comparam linhas.

Considerando os aspectos microbiológicos da levedura Thermo-Resistente durante o processo fermentativo dos mostos de milho produzidos, observou-se que o tempo e a temperatura de armazenamento dos grãos não impactaram sobre a viabilidade celular, índice de brotamentos e viabilidade de brotos, no início e final da fermentação (Figura 2), os valores referentes aos resultados da figura 3 estão em anexos (Tabela 8).



**Figura 2** – Resultados médios obtidos para viabilidade celular, brotamento e viabilidade de brotos no início e final do processo fermentativo de pasta de milho obtida de grãos de milho armazenados em diferentes condições. Teste F foi não significativo para todos os tratamentos. (A) Viabilidade celular, (C) Brotamento e (E) Viabilidade de brotos da levedura, no início e final da fermentação, de mostos preparados com grãos armazenados em diferentes tempos de armazenamento. (B) Viabilidade celular, (D) Brotamento e (F) Viabilidade de brotos da levedura, no início e final da fermentação, de mostos preparados com grãos armazenados em diferentes tempos de armazenamento.

Após caracterização dos aspectos microbiológicos da fermentação do mosto preparado a partir de grãos de milho, o próximo passo foi avaliar os metabólitos produzidos pela levedura e os aspectos químicos do vinho. Neste contexto avaliou-se o pH, ARRT, Glicerol e Teor Alcoólico do vinho. Esses resultados estão apresentados nas tabelas 4, 5, 6 e 7.

**Tabela 4** – Interação entre tempo e temperatura de armazenamento dos grãos sobre o pH do vinho

Dias de Armazenamento	Temperatura de Armazenamento (°C)			P
	25	35	45	
30	3,5 Aa	3,5 Aa	3,5 Aa	0,16
60	3,2 Bb	3,2 Bb	3,2 Ba	0,01
90	2,8 Eb	2,8 Dab	2,9 Da	0,02
120	3,0 Ca	2,9 Cb	3,0 Ca	0,01
180	2,9 Da	2,8 Da	2,7 Eb	0,01
<b>P</b>	0,01	0,01	0,01	

Legenda: Valores diferem de acordo com teste de Tukey (5%). Letras maiúsculas comparam coluna. Letras minúsculas comparam linhas.

**Tabela 5** – Interação entre tempo e temperatura de armazenamento dos grãos sobre os açúcares redutores residuais totais do vinho

Dias de Armazenamento	Temperatura de Armazenamento (°C)			P
	25	35	45	
30	0,18 Db	0,42 Da	0,53 Ba	0,01
60	0,03 Ec	1,85 Aa	0,37 Db	0,01
90	0,98 Cb	1,45 Ba	0,44 Cc	0,01
120	1,03 Ba	0,72 Cc	0,82 Ab	0,01
180	1,27 Aa	1,18 Ba	0,84 Ab	0,01
<b>P</b>	0,01	0,01	0,01	

Legenda: Valores diferem de acordo com teste de Tukey (5%). Letras maiúsculas comparam coluna. Letras minúsculas comparam linhas.

**Tabela 6** – Interação entre tempo e temperatura de armazenamento dos grãos sobre o glicerol do vinho

Dias de Armazenamento	Temperatura de Armazenamento (°C)			P
	25	35	45	
30	0,64 Db	0,65 Cb	0,71 Ca	0,01
60	0,70 Ca	0,68 Cab	0,65 Db	0,02
90	0,85 Ba	0,86 Ba	0,87 Ba	0,67
120	0,95 Aa	1,02 Aa	0,96 Aa	0,04
180	1,02 Aa	1,04 Aa	0,91 ABb	0,01
<b>P</b>	0,01	0,01	0,01	

Legenda: Valores diferem de acordo com teste de Tukey (5%). Letras maiúsculas comparam coluna. Letras minúsculas comparam linhas.

**Tabela 7** – Interação entre tempo e temperatura de armazenamento dos grãos sobre o teor alcoólico do vinho

Dias de Armazenamento	Temperatura de Armazenamento (°C)			P
	25	35	45	
30	6,1 Aa	6,0 Aa	5,8 Ba	0,07
60	5,9 ABb	6,1 Aab	6,2 Aa	0,02
90	5,3 Cb	5,8 ABa	5,5 BCab	0,01
120	5,7 Ba	5,5 Ba	5,5 Ca	0,20
180	5,1 Cab	5,1 Cb	5,4 Ca	0,01
<b>P</b>	0,01	0,01	0,01	

Legenda: Valores diferem de acordo com teste de Tukey (5%). Letras maiúsculas comparam coluna. Letras minúsculas comparam linhas.

#### 4. DISCUSSÃO

Considerando as pastas obtidas, observou-se que a temperatura de armazenamento dos grãos não influenciou o teor de °Brix, independente do número de dias em que os milhos permaneceram no estoque. Entretanto, pode-se verificar que o período de 120 dias de armazenamento reduziu em até 3% o teor de sólidos solúveis em todas as temperaturas avaliadas.

Comportamento semelhante foi observado para os Açúcares Redutores Totais, que não se alteraram em função da temperatura de armazenamento. Contudo, verificou-se incremento de ART da pasta, para grãos armazenados a 25 e 45°C por até 180 dias.

Embora o teor de açúcares não tenha variado de forma importante, o teor de amido da pasta aumentou conforme o tempo de armazenamento, considerando grãos de milho armazenados a 35 e 45°C.

Esses resultados são importantes, pois demonstram que o teor de carboidratos não foi afetado negativamente pelas condições de armazenamento dos grãos, possibilitando a maiores condições logísticas para a agroindústria. Além disso, o aumento dessas biomoléculas com o passar dos dias a elevadas temperaturas, pode ser decorrente da perda de umidade do grão e consequente concentração de açúcares e amido. Embora esse fator não foi avaliado, estudos futuros podem confirmar essa teoria.

Deve-se destacar ainda que os resultados foram superiores aos determinados por Lozano et al. (2020), que determinaram 13% de °Brix para pastas de 3 diferentes híbridos. Entretanto, os dados obtidos para amido e ART foram similares. Os autores trabalharam com grãos de milho recém colhidos, demonstrando que os resultados obtidos neste ensaio indicam que o armazenamento não afeta esses parâmetros.

Considerando os aspectos microbiológicos durante o processo fermentativo, verificou-se que não houveram diferenças significativas entre os tratamentos estudados, sendo que as diferentes condições de armazenamento dos grãos de milho não impactaram o desempenho da levedura Thermo-Ressitante durante a fermentação. Esse resultado é importante, pois demonstra que as possíveis alterações fisiológicas que eventualmente possam ter ocorrido no grão de milho não resultaram em biomoléculas prejudiciais a levedura, tais como fenóis (MESSIAS et al. 2016) ou ácidos orgânicos (CAMOLEZ; MUTTON, 2004).

Neste contexto, deve-se destacar ainda que os valores observados são similares aos determinados por Alcantara et al. (2020) e Lozano et al. (2020), que avaliando diferentes tipos de híbridos de milho, verificaram valores superiores a 85% de viabilidade celular e de brotos, bem como valores superiores a 10% para brotamentos para a levedura CAT-1 e BG-1, respectivamente. Esses valores são considerados adequados para o processo fermentativo, uma vez que resulta em elevados rendimentos industriais considerando a quantidade de etanol produzido por litros de caldo processado (BASSO et al. 2016).

Deve-se considerar ainda a particularidade do processo de fermentação do mosto de milho em relação à cana-de-açúcar. O processo utilizado para a agroindústria canavieira realiza a recuperação do fermento por centrifugação antes do vinho ser encaminhado para a destilação. O fermento recuperado é tratado e posteriormente reutilizado para nova fermentação (BASSO et al. 2011). Para o milho, o processo de recuperação de células de leveduras não ocorre, uma vez que o mosto em fermentação apresenta sólidos em suspensão derivados dos grãos que foram triturados e posteriormente submetidos ao processo de cozimento. Essas partículas aderem-se à levedura durante o processo de centrifugação convencional das indústrias canavieiras, inviabilizando o reaproveitamento do fermento.

Neste contexto, os processos que utilizam milho necessitam de dornas específicas para constante crescimento de massa celular de leveduras, para que possam alimentar reatores para fermentações únicas (BOTHAST; SCHLICHER, 2004). Desta maneira, esse modelo de produção carece de tecnologia para remoção prévia de partículas em suspensão, ou ainda de centrífugas que sejam seletivas para fermento e partículas de milho, possibilitando redução de custos e consequentes ganhos industriais no processo produtivo.

Observou-se que as fermentações apresentaram tempo entre 24 e 36h, resultando em °Brix do vinho inferior a 2% (dados não apresentados). Esses valores são compatíveis aos esperados para a fermentação do mosto de milho (MOSIER; ILELEJI, 2020). Além disso, os resultados indicam que houve metabolização interessante dos açúcares presentes no mosto, possibilitando teores alcoólicos superiores à 5%, bem como sobras de açúcares não fermentados inferiores à 2%. Lozano et al. (2020) e Alcantara et al. (2020) também obtiveram teores de etanol próximos à 5%

Embora os valores tenham sido dentro do esperado para fermentação alcoólica de mosto de milho, verificou-se que o tempo de armazenamento dos grãos impactou negativamente sobre os metabólitos produzidos nesse processo. Neste contexto, houveram maiores sobras de açúcares, maiores teores de ácidos e glicerol produzidos, e consequente redução do teor de etanol conforme aumentou-se o tempo de armazenamento. Esses resultados são interessantes, pois divergem dos índices estudados para a pasta e para viabilidade celular; e indicam que tempos de armazenamento dos grãos superiores a 90 dias reflete diretamente sobre o teor de etanol recuperado.

Considerando a temperatura de armazenamento, de modo geral, não foi observado diferenças entre os tratamentos para todos os parâmetros estudados. Essa informação também

é importante para o setor produtivo, uma vez que indica que países de elevada temperatura diária, como o caso do Brasil, há possibilidade de armazenamento dos grãos de milho em silos convencionais.

No caso específico do Brasil, pode-se destacar ainda que há viabilidade para construção do modelo de produção de “Usinas Flex”, as quais processam cana-de-açúcar durante a safra nos meses de abril a novembro (outono ao início do verão), e podem industrializar o milho durante os meses de dezembro a fevereiro (verão) (SILVA et al. 2020), período o qual há elevadas temperaturas e índice pluviométrico no país que inviabilizam a colheita da cana-de-açúcar possibilitando safra de etanol durante os 365 dias do ano.

## 5. CONCLUSÃO

Conclui-se que as temperaturas de armazenamento dos grãos de milho não influenciaram sobre a fisiologia da levedura nas diferentes temperaturas.

Porém, o armazenamento de grãos de milho por mais de 90 dias diminuiu significativamente o teor alcoólico do vinho, aumentando as sobras de açúcares e o glicerol produzido pela levedura. Esses fatores associados (açúcares e glicerol) podem reduzir o rendimento da unidade agroindustrial.

## REFERÊNCIAS

ACOSTA, L.; ELY, A.; MEDEIROS, E. P.; HAEBERLIN, L.; PARAGINSKI, R. T. **Qualidade do amido isolado em diferentes condições de temperatura e umidade de armazenamento dos grãos**. Anais. 8º Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão da UNIPAMPA, v. 8, n. 2, 2016.

ALCANTARA, G. U.; NOGUEIRA, L. C.; STRINGACI, L. A.; MOYA, S. M.; COSTA, G. H.G. Brazilian “Flex Mills”: Ethanol from sugarcane molasses and corn mash. **BioEnergy Research**. [s. l.], v. 13, p. 229-236, 2020.

BARBOSA, J. C.; MALDONADO JUNIOR, W. **Experimentação Agronômica & AgroEstat: Sistema para Análises Estatísticas de Ensaios Agronômicos**. FUNEP: Jaboticabal, 2015.

BASSO, L. C. **A Fermentação alcoólica: alguns aspectos bioquímicos, fisiológicos e microbiológicos.** V Semana De Fermentação Alcoólica “Jayme Rocha De Almeida”. Disponível em < <http://stab.org.br/fermentacao/BASSO> >. Acesso em: 27 de maio de 2021.

BASSO, L. C.; BASSO, T. O.; ROCHA, S. N. **Ethanol Production in Brazil: The Industrial Process and Its Impact on Yeast Fermentation,** Biofuel Production-Recent Developments and Prospects, p. 5-100, set. 2011. Disponível em < <http://www.intechopen.com/books/biofuel-production-in-brazil-the-industrial-process-and-its-impact-on-yeast-fermentation> >. Acesso em 21 de abril de 2021.

BOTHAST, R. J.; SCHLICHER, M.A. Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. **Applied Microbiology and Biotechnology.** [s. l.], v. 67, n. 1, 2004.

CAMARGO, C. M.; TALHAMENTO, A.; SILVA, R. S.; SANTOS, R. F.; PARAGINSKI, R. T.; OLIVEIRA, M. **Efeitos da Temperatura de Armazenamento na Qualidade Industrial de Grãos de Milho.** Anais. VI Conferência Brasileira De Pós-Colheita, 2014.

CAMOLEZ, M. A.; MUTTON, M. J. R. Influência de microrganismos contaminantes sobre o processo fermentativo. **STAB Açúcar, Álcool e Subprodutos,** [s. l.], v. 23, n. 5, p. 6-9, 2004.

CTC. Centro de Tecnologia Canavieira. **Manual de métodos de análises para açúcar.** Piracicaba, Centro de Tecnologia Canavieira, Laboratório de análises, CD ROM. 2005.

CHAVAN, S. M.; KUMAR, A.; JADHAV, S. J. Rapid quantitative analysis of starch in sugarcane juice. **International Sugar Journal,** Glamorgan, v. 93, n. 107, 1991.

LANE, J. **Biofuels Mandates Around the World,** 2018. Biofuels Digest: The world’s most widely read biofuels daily. Disponível em: < <http://www.biofuelsdigest.com/bdigest/2018/01/01/biofuels-mandates-around-the-world-2018/18/> >. Acesso em: 03 de jun. de 2021.

LEE, S. S.; ROBINSON, F. M.; WONG, H. Y. Rapid determination of yeast viability. **Biotechnology Bioengineering Symposium,** [s. l.], n. 11, 1981.

LNF. **Açúcar e etanol,** 2021. Disponível em: < <https://lnf.com.br/> >. Acesso em: 04 jul. 2021.

LOZANO, E. V.; ALCANTARA, G. U.; MOYA, S. M.; CIARAMELLO, S.; COSTA, G. H.G. Produção de Etanol a partir de diferentes híbridos de milho, 2017. **Revista brasileira de engenharia de biosistemas.** [s. l.], Tupã. v. 11, n. 3, 2020.

MESSIAS, R. C.; NOGUEIRA, L. C., COSTA, G. H. G.; Compostos fenólicos afetam a levedura durante o processo fermentativo. **Ciência & Tecnologia,** Jaboticabal, v. 8, Número especial, 2016.

MOSIER, N. S.; ILELEJI, K. E. How fuel ethanol is made from corn. **Biomass to Biofuels and Waste to Energy,** [s. l.], p. 539-544, 2020.

NOGUEIRA, L. C.; ALCANTARA, G. U.; MOYA, S. M.; COSTA, G. H. G. Extração de açúcares do grão de milho de 1,18mm em diferentes tempos de cozimento. p. 1162-1166. In: Anais. XII Congresso Brasileiro De Engenharia Química Em Iniciação Científica - **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n.4. São Paulo: Blucher, 2017.

PARAGINSKI, R. T.; VANIER, N. L.; BERRIOS, J. J.; OLIVEIRA, M.; ELIAS, M. C. Physicochemical and pasting properties of maize as affected by storage temperature. **Journal of Stored Products Research**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 209-214, 2014.

PARK, C-E.; KIM, Y-S.; PARK, K-J.; KIM, B-K. Changes in physicochemical characteristics of rice during storage at different temperatures. **Journal of Stored Products Research**, [s. l.], v. 48, p. 25-29, 2012.

REED, C.; DOYUNGAN, S.; IOERGER, B.; GETCHELL, A. Response of storage molds to different initial moisture contents of maize (corn) stored at 25oC, and effect on respiration rate and nutrient composition. **Journal of Stored Products Research**, [s. l.], v. 43, p. 443-458, 2007.

RFA. **Annual World Fuel Ethanol Production**. Renewable fuels association. Disponível em: < <https://ethanolrfa.org/statistics/annual-ethanol-production/> >. Acesso em: 04 de jun. de 2021.

SANTOS, G.; SOARES, M. B. B.; MARTINS, M. H.; POLLI, K. C.; CORREIA, N. A.; FINOTO, E. L. **Efeito residual de imazapic sobre a germinação e o desenvolvimento inicial de soja e milho em área de renovação de canavial**. 4º Encontro técnico sobre as culturas da soja e do milho no noroeste paulista, p. 105-114. 2019.

SBRUSSI, C. A. G.; ZUCARELI, C. Germinação sob altas temperaturas para avaliação do potencial fisiológico de sementes de milho, 2015. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 45, n. 10, 2015.

SILVA, H. J. T.; SANTOS, P. F. A.; NOGUEIRA-JUNIOR, E. C.; VIAN, C. E. F. Aspectos técnicos e econômicos da produção do etanol de milho no Brasil. **Revista de Política Agrícola**, [s. l.], v. 29, n. 4, p.142-159, 2020.

UNICADATA - **União da Indústria de Cana-de-açúcar**, 2019. Disponível em: < <http://www.unicadata.com.br/> >. Acesso em: 26 de jun. de 2021.

## APÊNDICE

**Tabela 8** – Valores médios obtidos para análises microbiológicas da levedura durante o processo fermentativo de mosto preparado a partir de grãos de diferentes híbridos de milho, armazenados por diferentes épocas e em diferentes temperaturas

HIB.	INÍCIO			FINAL		
	VIAB. CEL.	BROT.	VIAB. BROTOS	VIAB. CEL.	BROT.	VIAB. BROTOS
	%					
<b>DKL</b>	92	6,1	88	93	8,3	88 A
<b>PIO</b>	92	6,5	86	93	8,7	89 A
<b>SYN</b>	93	6,4	94	91	8,5	85 B
<b>TESTE F</b>	3,55ns	0,12ns	2,18ns	2,2ns	0,12ns	9,92*
<b>DMS</b>	18	1,18	3,0	26	1,29	0,3
<b>CV</b>	10,35	48,1	4,35	15,31	39,4	1,38
<b>TEMPO</b>	2,47ns	5,76**	0,80ns	1,8ns	13,8**	63,35**
<b>0</b>	94	8,1	100	95	11,2	95
<b>30</b>	92	7,3 A	89	94	10,6 A	88 B
<b>60</b>	92	7,4 A	86	92	8,5 A	73 C
<b>90</b>	94	5,3 AB	90	92	9,1 A	89 AB
<b>120</b>	91	6,9 AB	90	93	9,2 A	93 A
<b>180</b>	93	4,8 B	90	93	5,0 B	94 A
<b>DMS</b>	27	1,33	3,1	17	1,36	0,05
<b>CV</b>	12,78	41,92	4,35	7,94	33,5	1,60
<b>TEMP.</b>	1,01ns	0,04ns	1,53ns	0,7ns	2,58ns	1,75ns
<b>25</b>	93	6,2	85	92	9,2	86
<b>35</b>	92	6,3	92	93	8,1	88
<b>45</b>	93	6,4	90	93	8,2	88
<b>DMS</b>	16	0,84	5,2	13	0,8	0,03
<b>CV</b>	12,1	41,9	3,90	9,65	31,3	1,51

Legenda: Valores diferem de acordo com teste de Tukey (5%). Letras maiúsculas comparam coluna. Letras minúsculas comparam linhas. \*\*significativo ao nível de 1% de probabilidade. DMS – Desvio mínimo significativo. CV – Coeficiente de variação. ns – não significativo. Tempo 0 não foi avaliado conjuntamente com os dados do tempo, porém está na tabela como referencial.

HIB.: Híbridos, TEMP.: Temperatura, VIAB.: Viabilidade, CEL.: Celular, BROT.: Brotamento, DKL: Dekalb 636, PIO: Pioneer 3754, SYN: Syngenta 8454.