

ESTADO DA ARTE DA PRODUÇÃO DE ETANOL DE MILHO: UMA MINI-REVISÃO

D. Tinôco¹, Y. S. Lourenço², L. S. Alves², P. H. M. S. Machado², H. S. Gonçalves², C. P. Barreto²

¹*Departamento de Engenharia Bioquímica, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil (dtinoco@eq.ufrj.br)*

²*Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil*

O milho é promissor na transição energética via bioetanol, embora a estrutura do amido exija complexas etapas de solubilização e hidrólise. Este estudo revisou o estado da arte da produção de etanol amiláceo nos últimos 25 anos. As principais abordagens identificadas foram o desenvolvimento de transformantes amilolíticas, caracterização do amido, configurações do bioprocessos e outras estratégias operacionais, o que forneceu um arcabouço teórico para a produção de etanol de milho em larga escala.

Palavras-chave: Bioetanol; Amido; Engenharia Genética; Hidrólise; Vinhaça.

INTRODUÇÃO

O milho (*Zea mays*) é um dos cereais mais cultivados e consumidos globalmente, segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO). Suas principais aplicações incluem a alimentação humana e animal, produção de biocombustíveis (etanol, principalmente) e outros processos industriais à base de amido, sendo, portanto, um pilar central para a segurança alimentar e o agronegócio (FAO, 2026). Com uma produção de cerca de 1,2 bilhão de toneladas em 2024, o milho é considerado a segunda *commodity* mais importante do mundo, cuja produção perde apenas para a cana-de-açúcar. Os maiores produtores são os Estados Unidos da América (EUA), China e Brasil, respondendo por mais de 785 milhões de toneladas somente em 2024 (FAOSTAT, 2026). O mercado de milho foi estimado em aproximadamente US\$ 310,8 bilhões em 2025, com projeções de US\$ 372,4 bilhões para 2031, o que representa uma taxa de crescimento anual composta (do inglês, CARG) de 3,06% no período 2026-2031. Essa previsão se justifica por fatores estruturais favoráveis, como o aumento de dietas com maior teor proteico, desenvolvimento de culturas híbridas de alto rendimento, ampliação do armazenamento de grãos nas propriedades rurais, e metas de mistura de biocombustíveis à gasolina para reduzir a dependência de combustíveis fósseis e as emissões de gases de efeito estufa (Mordor Intelligence, 2026).

Nesse contexto, o milho tem ganhado cada vez mais expressividade enquanto matéria-prima para a geração de biocombustíveis como o etanol, principalmente em mercados onde tradicionalmente outros recursos naturais têm dominado a produção de bioenergia. Atualmente, Brasil e EUA respondem juntos por mais

de 80% da produção mundial de etanol combustível a partir de cana-de-açúcar e milho, respectivamente (EPE, 2025). O mercado de etanol foi estimado em US\$ 97,5 bilhões em 2025, com projeção de US\$ 141 bilhões para 2033, a uma CARG de 4,6% no período 2026-2033. O apoio regulatório por meio de incentivos fiscais e subsídios para combustíveis renováveis tem incentivado a expansão da capacidade produtiva e novos investimentos em projetos envolvendo a geração de bioetanol (Grand View Research, 2026).

Em 2024, dos 122 bilhões de litros de etanol combustível produzidos, 45,1 bilhões foram atribuídos ao Brasil. Desse montante, 7,8 bilhões de litros foram originados do milho, o que representa um aumento de 32% em relação ao ano anterior (EPE, 2025). O interesse no milho para a produção brasileira de etanol decorre, principalmente, da sua capacidade produtiva e possibilidade de manter o setor competitivo ao longo de todo o ano, especialmente no período entressafra da cana. Uma tonelada de milho é capaz de gerar de 400 a 460 L de etanol, e responder por mais de 70% da produção total de etanol combustível no período de dezembro a março (entressafra da cana), como verificado para a região Centro-Sul do país em 2024. Portanto, o etanol de milho tem apresentado grande relevância para o mercado nacional de bioenergia (MAPA, 2025).

No Brasil, a participação do milho na produção de etanol combustível tem sido também estimulada pela Política Nacional de Biocombustíveis (RenovaBio), de dezembro de 2017, como estratégia para atender aos compromissos globais sobre mudanças climáticas, segurança energética, descarbonização do setor de transportes e desenvolvimento sustentável (BRASIL,

2017). Além disso, o etanol de milho representa uma oportunidade de negócio de rápido retorno (*payback*), implantação e crescimento de mercado (*ramp-up*), requerendo um menor custo de capital (CAPEX) comparado ao etanol de cana de 1ª geração. A infraestrutura das tradicionais destilarias brasileiras pode ser otimizada para receber o milho, o que reduz a ociosidade das unidades de produção no período entressafra. Por fim, o portfólio industrial pode ser diversificado com o aproveitamento do óleo de milho e das frações proteicas, como DDG (do inglês, Grãos Secos de Destilaria) e DDGS (do inglês, Grãos Secos de Destilaria com Solúveis) (EPE, 2018).

Apesar das vantagens, o bioprocessamento de produção de etanol de milho enfrenta limitações associadas às características estruturais e cinéticas do amido. Diferentemente do caldo de cana-de-açúcar, rico em sacarose, um açúcar de fácil solubilização pelos tradicionais produtores microbianos de etanol, o amido requer uma etapa de desestruturação de seus grânulos formadores para disponibilização dos açúcares fermentescíveis (glicose). A digestibilidade do amido depende da composição de amilose e amilopectina, comprimento das cadeias formadoras, e cristalinidade, o que afeta diretamente o processo de hidrólise. Como resultado, etapas adicionais incluindo a gelatinização e liquefação do amido a elevadas temperaturas são necessárias. Além disso, uma etapa de sacarificação enzimática do amido, posterior ao pré-tratamento, é requerida, o que é alcançada a partir da aplicação de enzimas amilolíticas, principalmente, α -amilase e glucoamilase (Niu *et al.*, 2023). Do ponto de vista cinético, a estrutura macromolecular do amido é incapaz de penetrar nas células microbianas industriais típicas, o que exige o desenvolvimento de novas linhagens por engenharia genética (Wei *et al.*, 2024). Por fim, diferentes configurações do bioprocessamento podem ser estabelecidas visando à máxima eficiência de produção de etanol, o que inclui os sistemas SSF (do inglês, Sacarificação e Fermentação Simultâneas), SHF (do inglês, Hidrólise e Fermentação Separadas), SS_CF (do inglês, Sacarificação e Co-fermentação Simultâneas) e CBP (do inglês, Bioprocessamento Consolidado) (Tinôco, 2022).

O objetivo deste estudo foi determinar o estado da arte da produção de etanol amilolítico a partir de milho, destacando as principais abordagens investigadas nos últimos 25 anos para a sua viabilização técnica e econômica. Alguns dos documentos científicos indexados na plataforma Scopus (Elsevier), publicados no período 2000-2025, foram analisados e as suas informações sumarizadas nesta breve revisão. As investigações se concentraram principalmente em estudos envolvendo engenharia genética para o desenvolvimento de transformantes amilolíticos, caracterização do amido para otimização do seu pré-

tratamento e hidrólise, configurações operacionais das etapas de sacarificação e fermentação, aproveitamento de frações lignocelulósicas em sistemas de co-fermentação com o amido, e aplicação de estratégias de processo para aumento da eficiência econômica e energética do sistema. As informações apresentadas neste estudo poderão contribuir para os avanços necessários à produção industrial de etanol de milho, especialmente pelo Brasil, servindo como um referencial teórico para a consolidação do bioprocessamento em larga escala.

DESENVOLVIMENTO DE TRANSFORMANTES AMILOLÍTICAS

Para reduzir as operações unitárias do bioprocessamento, tornando-o mais eficiente e econômico, diferentes estudos têm investigado a construção de linhagens celulares capazes de hidrolisar e fermentar diretamente o amido de milho, a partir da expressão das enzimas α -amilase e glucoamilase por Engenharia Genética. A Figura 1 apresenta um esquema das principais estratégias de melhoramento genético dos produtores microbianos adotadas nos estudos analisados.

Shigechi *et al.* (2004) avaliaram comparativamente três sistemas recombinantes formados por linhagens flocculantes engenheiradas de *Saccharomyces cerevisiae* YF207, coexpressando glucoamilase de *Rhizopus oryzae* e α -amilase de *Bacillus stearothermophilus*, ancoradas à superfície celular, para a fermentação direta de amido de milho cozido em baixa temperatura (80 °C). Os sistemas foram denominados YF207/pGA11 (exibindo apenas glucoamilase ancorada à parede celular), YF207/pGA11/pSAA11 (exibindo apenas glucoamilase ancorada superficialmente, e secretando α -amilase no meio), e YF207/pGA11/pAA12 (exibindo ambas as enzimas ancoradas à superfície celular). As fermentações foram conduzidas em frascos agitados em batelada sob condições anaeróbicas a 30 °C. A cepa YF207/pGA11/pAA12 destacou-se ao produzir 18 g/L de etanol em 36 h a partir de 50 g/L de amido de milho cozido a 80 °C, o que correspondeu a um rendimento de 97,2% do valor teórico. Esse resultado foi considerado equivalente ao verificado em sistema convencional de cozimento a 120 °C, porém sem as severas limitações de gelatinização e viscosidade impostas pelas altas temperaturas. Aproveitando o menor intumescimento do amido a 80 °C, o sistema de coexpressão permitiu ainda elevar a concentração inicial de substrato para 90 g/L, inviável no processo convencional devido à gelatinização do amido, o que resultou em 30 g/L de etanol após 36 h, com rendimento de 98% do valor teórico. Os autores concluíram que a sinergia enzimática promovida pela

coexpressão de glucoamilase e α -amilase a partir do ancoramento junto à superfície celular representou uma estratégia promissora para a redução de custos energéticos e operacionais do sistema, contribuindo para uma produção eficiente de etanol a partir de amido de milho cozido a baixa temperatura.

Khaw *et al.* (2006) propuseram uma abordagem de engenharia de superfície celular (*cell-surface engineering*) focada no desenvolvimento e avaliação comparativa de 4 sistemas distintos de leveduras amilolíticas (sistemas A, B, C e D), construídos para a produção direta de etanol a partir de amido de milho cru. Os sistemas foram desenvolvidos utilizando linhagens de *S. cerevisiae* não-floculantes (YF237) e floculantes (YF207), modificadas geneticamente para expressar glucoamilase ancorada à parede celular e, de forma combinada, secretar α -amilase livre no meio de cultivo (sistemas A e C) ou coexpressar α -amilase também ancorada à superfície celular (sistemas B e D). As fermentações foram operadas em modo de batelada e batelada repetida (ao longo de 3 ciclos de 60 h) a 30 °C, em biorreator de bancada contendo 1,5 L de volume útil de meio. Durante as bateladas simples, o sistema A destacou-se significativamente ao alcançar uma taxa de produção específica de etanol de 0,18 g/g células secas/h, superando os valores de 0,06, 0,06 e 0,04 g/g células secas/h obtidos pelos sistemas B, C e D, respectivamente. Além disso, o monitoramento das fermentações repetidas demonstrou que o sistema A manteve uma hidrólise de substrato amiláceo superior (convertendo 81, 89 e 60 g de amido por litro em cada ciclo sucessivo) impulsionada por altas atividades enzimáticas específicas celulares, enquanto os demais sistemas sofreram limitações cinéticas de transporte e impedimento estérico por parte do amido granular insolúvel.

Yamakawa *et al.* (2012) desenvolveram uma linhagem de levedura capaz de expressar α -amilase e glucoamilase na superfície celular para a produção de bioetanol diretamente a partir do amido cru, sem a necessidade de realizar a sua hidrólise prévia, contribuindo para a redução dos custos e tempo do bioprocesso. A α -amilase foi originada da bactéria *Streptococcus bovis*, enquanto a glucoamilase foi isolada do fungo filamento *Rhizopus oryzae*. A expressão de quatro tipos diferentes de α -amilase foi testada: SBA (α -amilase nativa), SBAI (α -amilase com um domínio adicional de ligação ao substrato), SBAIL (SBAI com a extremidade C-terminal do domínio catalítico removida) e SBAILI (SBAI com um domínio catalítico adicional). Um rendimento médio de 76,6% do valor teórico e uma produtividade de etanol de 1,61 g/L/h foram obtidos pela linhagem diploide expressando SBAI e contendo um transportador de maltose AGT1, após 23 ciclos de bateladas repetidas, com reutilização dos resíduos

insolúveis após cada ciclo. Nenhuma perda de atividade enzimática foi observada durante o processo.

Favaro *et al.* (2015) construíram duas transformantes amilolíticas robustas de *S. cerevisiae* por integração de múltiplos genes codificantes de glucoamilase de *Thermomyces lanuginosus* (TLG1) e α -amilase de *Saccharomycopsis fibuligera* (SFA1). O desempenho fermentativo das cepas recombinantes M2n[TLG1-SFA1] e MEL2[TLG1-SFA1] foi testado em um processamento biológico consolidado (do inglês, CBP) conduzido em biorreator de bancada (1 L de volume útil) operando em batelada a 30 °C e 100 rpm. Uma alta carga de substrato cru (sem pré-tratamento ou adição de enzimas exógenas) de 200 g/L foi usada, juntamente com uma alta densidade de inóculo inicial de cerca de 50 g/L de células úmidas. Outras fontes naturais cruas como sorgo doce e tritcale (originário do cruzamento entre trigo e centeio) foram também avaliadas. Altos valores de atividade enzimática em amido solúvel bruto foram verificadas para ambas as cepas, o que resultou em uma produção de cerca de 64 g/L de etanol pela transformante M2n, correspondente a 55% do rendimento teórico, e de aproximadamente 52,4 g/L de etanol (45,1% do rendimento teórico) por MEL2. Uma vez que os melhores resultados foram obtidos por M2n, os ensaios avaliando os demais substratos agrícolas crus foram conduzidos usando essa levedura engenheirada. Como resultados, foram obtidos aproximadamente 51,5 g/L de etanol a partir de tritcale (73% do rendimento teórico e 99% de amido degradado) e 50,7 g/L a partir de sorgo doce (62% do rendimento teórico e 85% de amido degradado), o que comprovou a eficácia da engenharia genética na melhoria do bioprocesso de produção de etanol.

Seong *et al.* (2017) avaliaram os efeitos da superexpressão de um mutante do gene SPT15 (variante SPT15-M3, contendo as mutações S42N, S78R, S163P e I212N) sobre o ganho de robustez celular e eficiência de produção de etanol por *S. cerevisiae* BY4741. Os autores compararam o desempenho da cepa engenheirada BSPT15-M3 com o do controle selvagem expressando o gene SPT15 (denominado BSPT15wt) em ensaios conduzidos em batelada, batelada alimentada e SSF (Sacarificação e Fermentação Simultâneas) a 30 °C. Em cultivos em batelada sob alta carga inicial de glicose (280–310 g/L), a transição para uma condição microaeróbica controlada (200 rpm e 0,1 vvm) revelou-se um fator limitante ideal, permitindo que a cepa mutante BSPT15-M3 consumisse 275 g/L de substrato em 41 h e atingisse taxas de consumo (6,71 g/L/h) e produtividade de etanol (2,50 g/L/h) aproximadamente 1,4 vezes superiores às reportadas por BSPT15wt. Nos ensaios em batelada alimentada, a cepa BSPT15-M3 exibiu maior tolerância osmótica

frente aos choques de glicose aplicados sob concentrações elevadas de etanol (50–80 g/L), o que permitiu índices de consumo e produtividade de 9,5 a 13,4% maiores que os encontrados para BSPT15wt. A viabilidade técnica de BSPT15-M3 foi ratificada em processos de SSF usando substratos complexos de amido liquefeito de mandioca e milho, nos quais uma massa final de etanol de 162,5 g, a uma produtividade de 1,67 g/h, foi alcançada, superando os resultados encontrados para a cepa BSPT15wt. Esse estudo validou a engenharia global do maquinário de transcrição como uma estratégia eficaz para o desenvolvimento de linhagens industriais robustas para a produção eficiente de bioetanol.

Cripwell *et al.* (2019) realizaram a construção e otimização genômica de duas linhagens de *S. cerevisiae* Y294 (denominadas ER e M2n) para aplicação em CBP de amido de milho cru contendo elevado teor inicial de substrato, em torno de 200 g/L. O estudo baseou-se no uso de genes de fungos

filamentos amilolíticos, responsáveis pela degradação de amido granular. Os genes de glucoamilase otimizada por códons (*temG_Opt*) e α -amilase nativa (*temA*) de *Talaromyces emersonii* foram selecionados e inseridos simultaneamente nos genomas das leveduras industriais por meio de cassetes de integração δ . Os ensaios fermentativos foram conduzidos em biorreator de 2 L, operado em batelada a 30 °C e 300 rpm. Nessas condições, produções de cerca de 89,3 e 98,1 g/L de etanol, com conversões de carbono de aproximadamente 87 e 94%, foram alcançadas pelas cepas ER e M2n, respectivamente. A conversão direta de amido de milho cru em etanol em uma única etapa por essas leveduras recombinantes reduziu a necessidade de utilização de enzimas exógenas em 90%, o que contribuiu para a economia de produção. As transformantes obtidas no estudo foram consideradas eficientes vias de secreção enzimática integrada ao metabolismo energético celular, capazes de produzir etanol a um menor custo total do bioprocessamento.

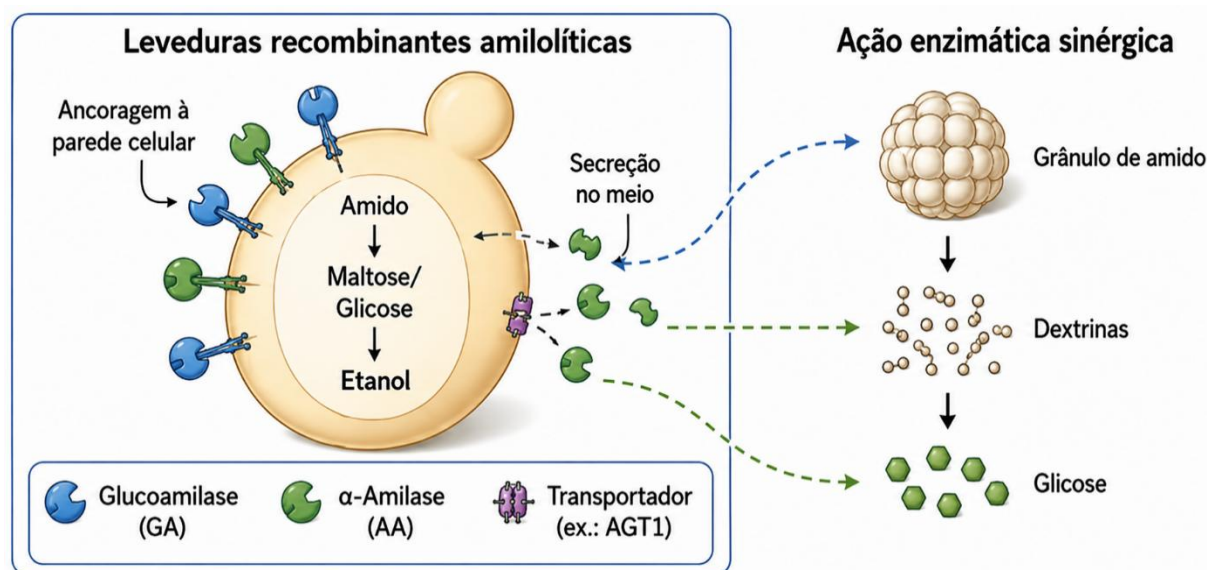


Figura 1. Principais estratégias de construção de transformantes amilolíticos por engenharia genética reportadas nos últimos 25 anos na plataforma Scopus (Elsevier). A imagem foi gerada com auxílio de inteligência artificial.

CARACTERIZAÇÃO DO AMIDO

Diferentes estudos têm investigado as características estruturais (composição) e morfológicas do amido de milho, responsáveis por afetar a eficiência de hidrólise e, consequentemente, o rendimento do processo fermentativo de produção de etanol. A Figura 2 apresenta um esquema das principais informações sobre a estrutura e morfologia dos grânulos de amido de milho, e a sua relação com a eficiência de hidrólise, reportadas nos estudos analisados.

Características estruturais e morfológicas do amido de milho

Wu *et al.* (2006) avaliaram os efeitos da composição de diferentes matérias-primas amiláceas (milho, trigo e sorgo) em termos de amilose, proteínas e fibras, sobre a disponibilização e conversão de amido em etanol. Em amostras com alto teor de amilose, a etapa de cozimento (pré-tratamento) foi investigada a elevadas temperaturas (120, 140 e 160 °C) para se determinar a condição de maior digestibilidade do amido. A fermentação foi conduzida em frascos agitados a 30 °C, pH 4,2-4,3 e 150 rpm por 72 h, usando a levedura *S. cerevisiae* ATCC 24860. Os resultados encontrados mostraram pouca influência das proteínas e fibras sobre o processo fermentativo,

enquanto a amilose atuou de forma negativa, reduzindo a eficiência de produção em elevadas concentrações. Os autores atribuíram esse efeito à formação de complexos amilose-lipídios, particularmente resistentes à hidrólise, resultantes do aumento da concentração de amilose no amido. O cozimento de matérias-primas contendo até 70% de amilose a 160 °C foi considerado ideal para romper a barreira adicional imposta pelo complexo amilose-lipídio, o que aumentou a eficiência do bioprocessamento. Ao contrário, as amostras com baixo teor de amilose, inferior a 35%, apresentaram leve redução na eficiência da fermentação, possivelmente devido à ocorrência de reações químicas paralelas em altas temperaturas, responsáveis por consumirem parte da matéria-prima utilizada para a produção de etanol.

Naguleswaran *et al.* (2012) investigaram os efeitos das características morfológicas, estruturais e físico-químicas sobre o grau de amilólise de grânulos de amido de diferentes tamanhos e fontes, incluindo triticale, trigo e milho. Os grânulos pequenos e grandes desses materiais foram fracionados por sedimentação centrífuga e hidrolisados por uma preparação enzimática, contendo α -amilase e glucoamilase, a temperaturas de sub-gelatinização. Os grânulos grandes apresentaram uma menor proporção em peso em relação ao total de grânulos no amido de milho. Um maior número de poros de superfície e

canais internos foi também verificado para o amido de milho em comparação com as demais fontes naturais, a partir da análise de imagens geradas por MEV (microscopia eletrônica de varredura). O grau de hidrólise de amido de milho foi cerca de 17,7% maior nos grânulos pequenos, alcançando um valor final médio para grânulos grandes e pequenos de 80,8-83,4% após 72 h. O estudo foi considerado fundamental para o controle da liquefação e sacarificação de amido por SSF, visando à uma produção eficiente de bioetanol.

Yangcheng *et al.* (2013) investigaram o efeito das estruturas e propriedades do amido de milho não cozido sobre as taxas de hidrólise para a produção de etanol por fermentação a frio. Dois tipos de amido foram avaliados, diferenciando-se pela composição de amilose e amilopectina: normal e ceroso. O amido normal continha maior concentração de amilose, enquanto o amido ceroso apresentava elevado teor de amilopectina. A menor quantidade de amilose e o menor comprimento médio da cadeia ramificada de amilopectina do amido ceroso foram responsáveis pelas altas taxas de hidrólise verificadas. A eficiência média final de conversão do amido em etanol foi de aproximadamente 88,2% (milho normal) e 93% (milho ceroso), o que resultou em produções na faixa de 34,2-37,5 e 34,6-37,9 g/100 g grãos moídos a seco, respectivamente.

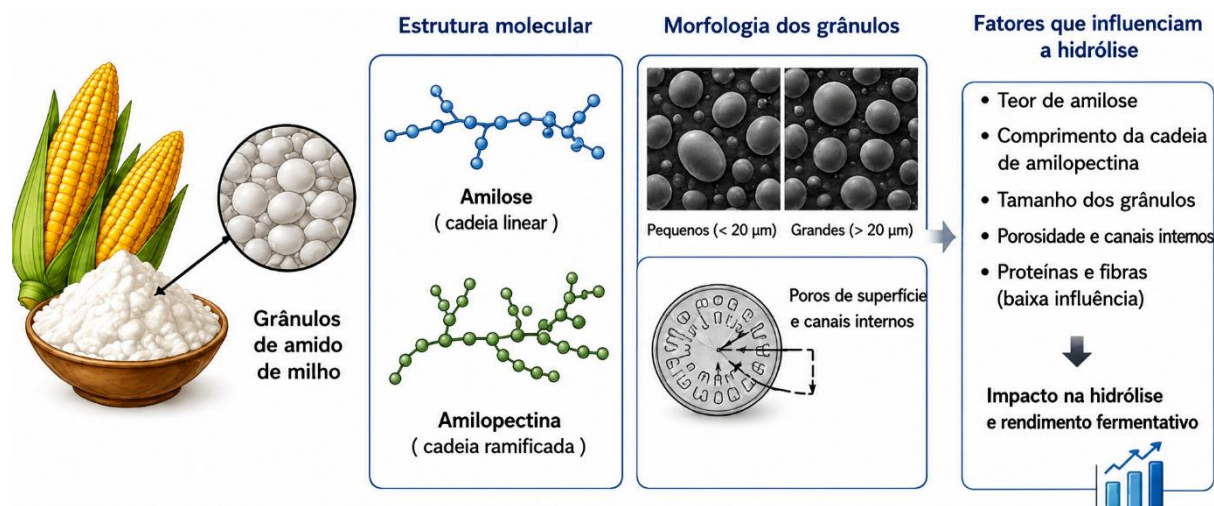


Figura 2. Principais informações estruturais e morfológicas dos grânulos de amido de milho e sua relação com a eficiência de hidrólise reportadas nos últimos 25 anos na plataforma Scopus (Elsevier). A imagem foi gerada com auxílio de inteligência artificial.

Pré-tratamento do amido de milho

Myat *et al.* (2013) investigaram a extrusão com injeção de α -amilase termoestável em diferentes temperaturas de fusão (95, 115 e 135 °C) como método de pré-tratamento do amido de milho para a produção de etanol. Usando uma extrusora de rosca dupla operando a 115 °C, os autores conseguiram

melhorar as propriedades funcionais do amido e eliminar a necessidade da etapa de sacarificação. Como resultado, o processo fermentativo conduzido em frascos agitados em batelada a 30 °C, pH 3,8 e 200 rpm foi favorecido, o que levou à uma produção por *S. cerevisiae* ATCC 24858 de aproximadamente 288 g/L de etanol, com rendimento de 85,75%, em 36 h de cultivo.

CONFIGURAÇÕES DO BIOPROCESSO

Diferentes estratégias de operação do bioprocessamento têm sido avaliadas nos últimos 25 anos para o aumento da eficiência de produção de etanol de amido de milho. Os trabalhos publicados têm investigado principalmente a Sacarificação e Fermentação

Simultâneas (SSF) e a Sacarificação e Co-fermentação Simultâneas (SScF), quando nenhuma modificação genética é realizada nos produtores microbianos. A Figura 3 apresenta um esquema das principais estratégias de configuração do bioprocessamento, reportadas nos estudos analisados.

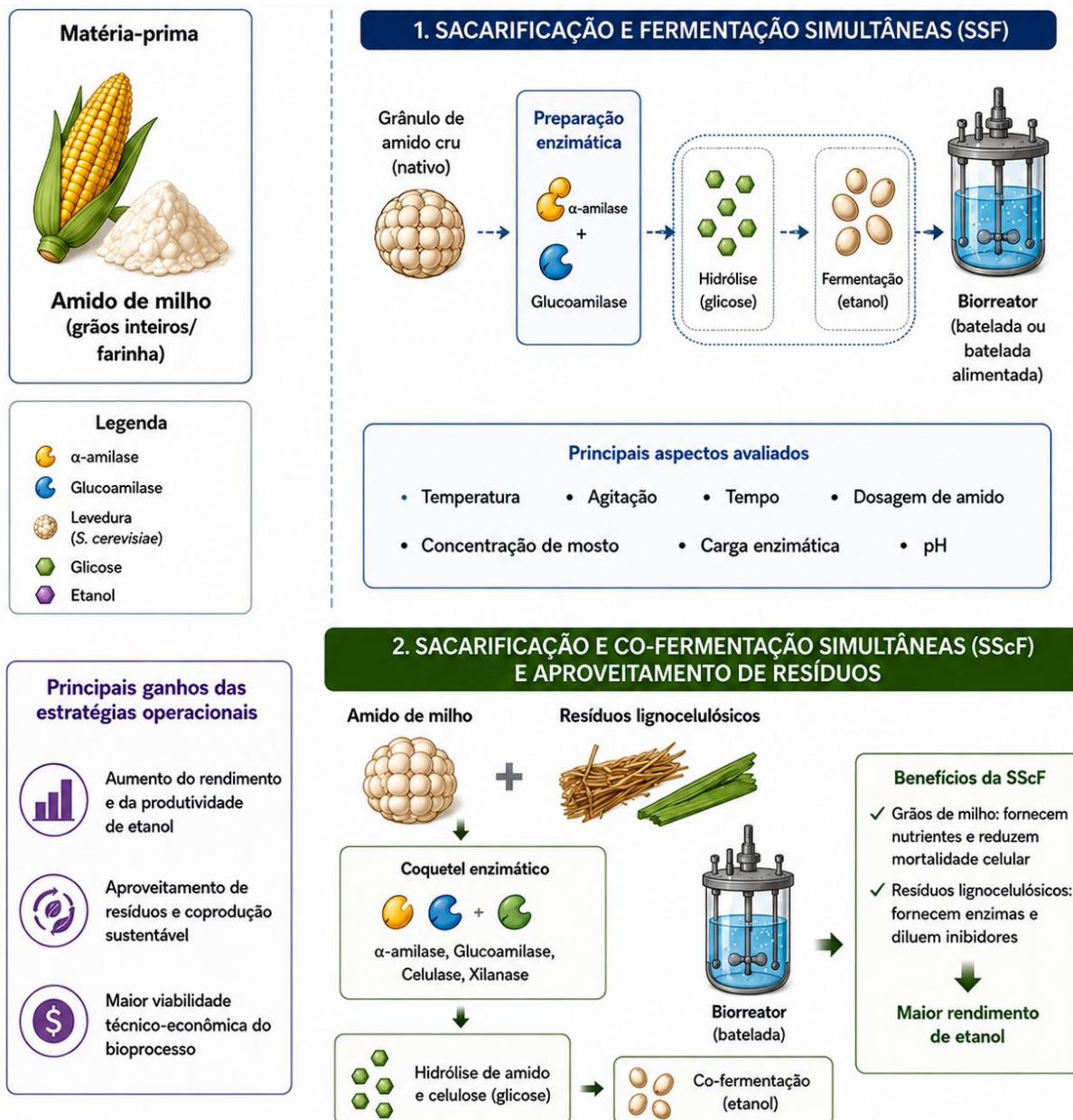


Figura 3. Principais estratégias de configuração do bioprocessamento de produção de etanol de amido de milho reportadas nos últimos 25 anos na plataforma Scopus (Elsevier). A imagem foi gerada com auxílio de inteligência artificial.

Sacarificação e fermentação do amido de milho

Szymanowska e Grajek (2009) propuseram um sistema aprimorado de produção de etanol que incluía o processo de SSF em batelada alimentada e uma preparação enzimática comercial contendo α -amilase

e glucoamilase, capaz de hidrolisar amido de milho granular cru nativo. Os autores investigaram os efeitos de algumas variáveis operacionais sobre o rendimento de bioetanol, que incluíram temperatura, taxa de agitação do mosto, tempo de fermentação e dosagem da farinha de milho. A levedura industrial *S.*

cerevisiae Red Star Ethanol Red (linhagem termotolerante comercial, capaz de crescer entre 30 e 40 °C e resistir a concentrações de etanol de até 18% v/v) foi utilizada, juntamente com o complexo enzimático comercial Stargen 001, formado por α -amilase de *Aspergillus kawachi* e glucoamilase de *A. niger* (ativada abaixo da temperatura de gelatinização do amido). Os ensaios experimentais foram conduzidos em biorreator de bancada com volume útil de 4 L e pH inicial de 5, sob condições anaeróbicas não estéreis. As melhores condições reportadas foram: temperatura de 37 °C, agitação de 200 rpm, tempo de 72 h, e dosagem de amido disponibilizado em duas porções (2/3 no início e 1/3 após 24 h). Como resultado, uma concentração final de etanol de 10,4% (m/v), correspondendo a 90% do rendimento teórico, foi verificada. Os autores concluíram que o processo SSF em batelada alimentada com amido granular nativo e a preparação enzimática contendo α -amilase e glucoamilase eliminaram a necessidade da etapa de liquefação térmica, responsável por um alto consumo energético. Com isso, uma maior viabilidade técnico-econômica, com satisfatórios rendimentos fermentativos, pôde ser alcançada, o que deverá contribuir para a produção de bioetanol em larga escala.

Białas *et al.* (2014) avaliaram os efeitos quantitativos da concentração de mosto contendo amido de farinha de milho, carga enzimática de amiloglicosidase do tipo GSHE (do inglês, Enzima Hidrolisante de Amido Granular), e pH do meio sobre a produção de etanol em processo de SSF usando a levedura *S. cerevisiae* Ethanol Red. Os autores realizaram a otimização dessas variáveis por meio da aplicação de um delineamento experimental do tipo composto central rotacional (do inglês, DCCR), o que permitiu a construção de um modelo cinético não estruturado relacionando as taxas de consumo de amido e glicose e de formação de biomassa celular e etanol para previsões de produção do bioprocessos. Uma concentração máxima de aproximadamente 110,4 g/L de etanol, com rendimento de 85,7% do valor teórico, foi alcançada sob condições de 25% em massa de mosto, 2,05 mL/kg de carga enzimática, e pH 5 nos ensaios finais de validação do modelo. Perfis temporais de consumo de amido, liberação transiente de glicose residual próxima a zero e acúmulo de biomassa celular puderam ser estimados pelo modelo cinético proposto. Por fim, os autores identificaram modificações físicas nos grânulos residuais de amido, caracterizadas por furos distribuídos aleatoriamente em suas superfícies por meio da análise de imagens geradas por MEV, o que comprovou a eficiente conversão do carbono verificada no estudo.

Co-fermentação e aproveitamento de resíduos proteicos

Tang *et al.* (2011) investigaram a fermentação conjunta de amido de milho e resíduos lignocelulósicos do processo produtivo comercial de furfural (RLFs) para a produção melhorada de bioetanol. Os autores conduziram ensaios de SSf, que foram responsáveis por converterem a celulose, presente nos grãos de milho e RLFs, em etanol. O aproveitamento concomitante dessas duas matérias-primas foi considerado vantajoso devido aos benefícios mútuos alcançados. Enquanto os grãos de milho forneceram importantes nutrientes às células microbianas, o que contribuiu para a redução da mortalidade celular do bioprocessos, os RLFs disponibilizaram enzimas celulósicas para a conversão de polissacarídeos presentes no milho, que convencionalmente não seriam convertidos em etanol. Além disso, o hidrolisado de milho contribuiu para a diluição dos inibidores enzimáticos presentes nos RLFs, o que resultou em maiores rendimentos de etanol. Uma concentração final de 73,1 g/L de etanol (rendimento de 101,1% com base na celulose do milho e dos RLFs) foi obtida após 120 h, empregando-se cerca de 14,5 % (m/v) de grãos de milho e 7,5 % (m/v) de RLFs, em meio contendo sais minerais.

Li *et al.* (2022) propuseram uma abordagem integrativa para otimizar a produção de bioetanol de milho (fração glicídica), reaproveitando a torta residual (fração proteica) gerada no processo de moagem a seco. Ao combinar a extração de proteínas de alta qualidade para ração animal com a reciclagem de resíduos sólidos e líquidos, os autores aplicaram um pré-tratamento quimioenzimático em duas etapas, em que os sólidos foram inicialmente extraídos com ácido diluído, seguido da hidrólise utilizando coquetel enzimático. Amido comum foi utilizado, juntamente com α -amilase e glucoamilase, além de celulase e xilanase para a torta residual. Um processo de SSF usando uma linhagem de *S. cerevisiae* foi conduzido em frascos agitados em batelada. A massa final de etanol gerada foi de 357,33 kg por tonelada de milho seco. O milho residual foi usado como ração animal, enquanto a vinhaça gerada foi reaproveitada no processo.

Kukielski *et al.* (2023) avaliaram o impacto da adição de celulasas na fermentação do amido de milho, comparando a produção de etanol 1G e 1,5G *in situ* (G=geração). Por meio da aplicação de métodos analíticos validados, os autores reportaram um aumento de 2% na produção de etanol no processo 1,5G, impulsionado pela maior conversão de amido resistente (amido total menos amido fermentável) e celulose. Os autores utilizaram amido de milho regular e com alto teor de amilose, que foram submetidos a um pré-tratamento caracterizado por uma etapa de liquefação térmica a 85 °C por 90 min. A hidrólise enzimática foi realizada usando α -amilase,

glucoamilase e celulase em um processo do tipo SSF, conduzido em frascos agitados em batelada. A produção final de etanol 1G e 1,5G foi de cerca de 116,5 e 117,9 g/L, respectivamente.

OUTRAS ESTRATÉGIAS OPERACIONAIS

O consumo e a geração de água no bioprocessamento de etanol de milho representam um importante impasse ambiental e econômico, capaz de afetar a sua produção

em larga escala (Mekonnen *et al.*, 2018). Outros fatores como a natureza das fontes de carbono e energia podem comprometer a viabilidade econômica do bioprocessamento, uma vez que são responsáveis por pelo menos 50% em média dos custos de produção (Tinôco *et al.*, 2020). A Figura 4 apresenta um esquema de outras estratégias operacionais investigadas para o aumento da viabilidade técnico-econômica e ambiental da produção de etanol de amido de milho, reportadas nos estudos analisados.



Figura 4. Outras estratégias operacionais para o aumento da viabilidade técnico-econômica e ambiental do bioprocessamento de produção de etanol de amido de milho reportadas nos últimos 25 anos na plataforma Scopus (Elsevier). A imagem foi gerada com auxílio de inteligência artificial.

Białas *et al.* (2010) investigaram o efeito do reaproveitamento da vinhaça (principal subproduto líquido e pastoso gerado no final da destilação fracionada do etanol) na produção de etanol combustível a partir de amido granular nativo de farinha de milho, visando mitigar a geração de poluentes industriais. O bioprocessamento foi conduzido por SSF em modo de batelada repetida de longo prazo (composta por 3 ciclos sucessivos), utilizando a levedura *S. cerevisiae* Ethanol Red e um complexo comercial de enzimas hidrolíticas de amido granular (do inglês, GSHE). As fermentações foram operadas em biorreator de bancada com volume de trabalho de 3 L, mantendo-se a temperatura a 35 °C e pH 4,2, com uma carga inicial de substrato correspondente a 25% em peso. Os resultados demonstraram que a substituição de até 75% da água fresca por vinhaça reciclada não afetou negativamente o rendimento do processo, mantendo uma eficiência média estável de cerca de 83,4% do valor teórico, e sem apresentar tendências de queda na concentração final de etanol ou acúmulo de amido residual ao longo das corridas consecutivas. Os autores concluíram se tratar de uma

tecnologia limpa, com elevado potencial ecológico e técnico, responsável por reduzir consideravelmente o consumo de água e a geração de vinhaça e outros poluentes orgânicos.

Szymanowska e Grajek (2011) desenvolveram uma tecnologia para a produção de etanol a partir da digestão enzimática direta do amido nativo presente em amostras de farinha de milho, sem a necessidade das etapas de gelatinização e liquefação. Baseada na combinação entre o processo SSF e a recirculação da fração líquida da vinhaça, os autores conseguiram produzir cerca de 91,9 g/L de etanol a partir da utilização de mais de 90% de amido nativo, o que representou um rendimento de 87,5% do valor teórico. Paralelamente, os autores puderam otimizar o consumo de energia e reduzir consideravelmente a quantidade de água demandada como insumo e o efluente líquido gerado no processo fermentativo.

Li *et al.* (2017) investigaram fontes de nitrogênio de baixo custo, alternativas ao tradicional e comumente usado extrato de levedura, em fermentação de amido de milho de alta concentração inicial de açúcar (do inglês, VHGF – *very high gravity fermentation*), em

torno de 340 g/L. Esse composto foi parcialmente substituído por ureia e sulfato de amônio, após otimização da produção de etanol por planejamento de experimentos do tipo DCCR. A suplementação do meio de cultura com 0,6 % (m/v) de extrato de levedura, 69 mM de ureia e 26 mM de sulfato de amônio resultou em um rendimento médio de etanol e eficiência de fermentação de 20,2% (v/v) e 84,2%, respectivamente, o que foi comparável aos resultados encontrados usando 2,0 % (m/v) de extrato de levedura como única fonte de nitrogênio.

CONCLUSÃO

Esta breve revisão do estado da arte da produção de etanol de amido de milho revelou que as principais abordagens investigadas nos últimos 25 anos para garantir a viabilidade técnica, econômica e ambiental do bioprocessamento incluíram a engenharia genética dos tradicionais produtores microbianos, a caracterização completa do amido em termos de estrutura, morfologia e propriedades físico-químicas, as diferentes configurações de condução das etapas de sacarificação e fermentação, e outras estratégias operacionais voltadas à eficiência do processo industrial. A consolidação de linhagens microbianas transformantes capazes de expressar enzimas amilolíticas de forma eficiente, aliada à otimização de configurações integradas, como SSF e SSf, têm sido determinantes para a redução de custos com insumos térmicos e enzimáticos. Adicionalmente, a viabilidade de longo prazo do processo tem exigido estratégias de mitigação da pegada hídrica e dos custos energéticos associados à hidrólise e fermentação do amido de milho, resultante da sua complexidade estrutural e cinética. Portanto, este estudo forneceu um referencial teórico capaz de subsidiar o planejamento técnico e direcionar novas pesquisas focadas no escalonamento sustentável desse bioprocessamento, especialmente no contexto brasileiro de descarbonização e segurança energética da indústria de combustíveis.

REFERÊNCIAS

- BIALAS, W.; SZYMANOWSKA, D.; GRAJEK, W. Fuel ethanol production from granular corn starch using *Saccharomyces cerevisiae* in a long term repeated SSF process with full stillage recycling. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 101, n. 9, p. 3126–3131, maio 2010.
- BIALAS, W.; CZERNIAK, A.; SZYMANOWSKA-POWAŁOWSKA, D. Kinetic modeling of simultaneous saccharification and fermentation of corn starch for ethanol production. **Acta Biochimica Polonica**, [S. l.], v. 61, n. 1, p. 153–162, mar. 2014.
- BRASIL. [Presidência da República]. **Lei nº 13.576, de 26 de dezembro de 2017**. Dispõe sobre a Política Nacional de Biocombustíveis (RenovaBio) e dá outras providências. Brasília, DF: Presidência da República, 2017. Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2017/lei/113576.htm. Acesso em: 29 jun. 2026.
- CRIPWELL, R. A. et al. Construction of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains for the efficient consolidated bioprocessing of raw starch. **Biotechnology for Biofuels**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 201, dez. 2019.
- EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA (EPE). **Cenários de produção de etanol de milho no Brasil**. Rio de Janeiro: EPE, [2018?]. Disponível em: https://www.epe.gov.br/sites-pt/sala-de-imprensa/noticias/Documents/8-IBP1710_18%20CEN%C3%81RIOS%20DE%20PRODU%C3%87%C3%83O%20DE%20ETANOL%20DE%20MI LHO%20NO%20BRASIL.pdf. Acesso em: 29 jun. 2026.
- EMPRESA DE PESQUISA ENERGÉTICA (EPE). **NT-EPE-DPG-SDB-2025-06: Análise de Conjuntura Ano base 2024**. Brasília, DF: EPE, 2025. Disponível em: https://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-904/NT-EPE-DPG-SDB-2025-06_An%C3%A1lise%20de%20Conjuntura_Ano%20base%202024.pdf. Acesso em: 29 jun. 2026.
- FAVARO, L. et al. Consolidated bioprocessing of starchy substrates into ethanol by industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains secreting fungal amylases. **Biotechnology and Bioengineering**, [S. l.], v. 112, n. 9, p. 1751–1760, set. 2015.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). **Crop Information: Maize**. [S. l.]: FAO, [2026?]. Disponível em: <https://www.fao.org/land-water/databases-and-software/crop-information/maize/en/>. Acesso em: 29 jun. 2026.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION CORPORATE STATISTICAL DATABASE (FAOSTAT). **Data: QCL**. [S. l.]: FAOSTAT, [2026?]. Disponível em: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL/visualize>. Acesso em: 29 jun. 2026.
- GRAND VIEW RESEARCH. **Ethanol Market Size, Share & Trends Analysis Report**: By Source (Grain-based, Sugar-based), By Application (Fuel, Industrial, Beverage), By Region, And Segment Forecasts. [S. l.]: Grand View Research, [2026?]. Disponível em: <https://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/ethanol-market>. Acesso em: 29 jun. 2026.
- KHAW, T. S. et al. Evaluation of performance of different surface-engineered yeast strains for direct ethanol production from raw starch. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 70, n. 5, p. 573–579, maio 2006.
- KUKIELSKI, P. et al. Co-Production of Ethanol from Starch and Cellulose in Corn during Simultaneous Saccharification and Fermentation. **Industrial Biotechnology**, [S. l.], v. 19, n. 3, p. 163–167, jun. 2023.
- LI, Z.; WANG, D.; SHI, Y-C. Effects of nitrogen source on ethanol production in very high gravity fermentation of corn starch. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, [S. l.], v. 70, p. 229–235, jan. 2017.

LI, X. et al. An integrative approach enables high bioresource utilization and bioethanol production from whole stillage. **Bioresource Technology**, [S. l.], v. 343, p. 126153, jan. 2022.

MAPA. Ministério da Agricultura e Pecuária. **Sustentabilidade/Agroenergia**. Brasília, DF: MAPA, 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/ptbr/assuntos/sustentabilidade/agroenergia>. Acesso em: 29 jun. 2026.

MEKONNEN, M. M. et al. Water Footprint of Bioethanol from Corn in the United States. **Environmental Science & Technology**, [S. l.], v. 52, n. 24, p. 14508-14518, 2018.

MORDOR INTELLIGENCE. **Maize Market Size & Share Analysis: Growth Trends & Forecasts**. [S. l.]: Mordor Intelligence, [2026?]. Disponível em: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/maize-market>. Acesso em: 29 jun. 2026.

MYAT, L. Extrusion with Thermostable α -amylase Injection as Pretreatment Method for Ethanol Production from Corn Starch. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, [S. l.], v. 5, n. 2, p. 47–53, 2013.

NAGULESWARAN, S. et al. Amylolysis of large and small granules of native triticale, wheat and corn starches using a mixture of α -amylase and glucoamylase. **Carbohydrate Polymers**, [S. l.], v. 88, n. 3, p. 864–874, abr. 2012.

NIU, L. et al. Genetic Engineering of Starch Biosynthesis in Maize Seeds for Efficient Enzymatic Digestion of Starch during Bioethanol Production. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 24, n. 4, p. 3927, 2023.

SEONG, Y.-J. et al. Expression of a mutated SPT15 gene in *Saccharomyces cerevisiae* enhances both cell growth and ethanol production in microaerobic batch, fed-batch, and simultaneous saccharification and fermentations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 101, n. 9, p. 3567–3575, maio 2017.

SHIGECHI, H. et al. Energy-saving direct ethanol production from low-temperature-cooked corn starch using a cell-surface engineered yeast strain co-displaying glucoamylase and α -amylase. **Biochemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 18, n. 2, p. 149–153, maio 2004.

SZYMANOWSKA, D.; GRAJEK, W. Fed-batch simultaneous saccharification and ethanol fermentation of native corn starch. **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, [S. l.], v. 8, n. 4, p. 5–16, 2009.

SZYMANOWSKA, D.; GRAJEK, W. Energy-saving and by-products-free production of ethanol from granular corn starch. **BioTechnologia**, [S. l.], v. 92, n. 1, p. 85–91, out. 2011.

TANG, Y. et al. Simultaneous saccharification and cofermentation of lignocellulosic residues from commercial furfural production and corn kernels using different nutrient media. **Biotechnology for Biofuels**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 22, dez. 2011.

WEI, Y. et al. Desenvolvimento de uma cepa de *Zymomonas mobilis* fermentadora de amido para produção de bioetanol. **Microbial Cell Factories**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 301, 2024.

WU, X. et al. Effects of Amylose, Corn Protein, and Corn Fiber Contents on Production of Ethanol from Starch-Rich Media. **Cereal Chemistry**, [S. l.], v. 83, n. 5, p. 569–575, set. 2006.

YAMAKAWA, S. et al. Repeated fermentation from raw starch using *Saccharomyces cerevisiae* displaying both glucoamylase and α -amylase. **Enzyme and Microbial Technology**, [S. l.], v. 50, n. 6–7, p. 343–347, maio 2012.

YANGCHENG, H. et al. Characterization of Normal and Waxy Corn Starch for Bioethanol Production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 61, n. 2, p. 379–386, jan. 2013.