

AUMENTO DA PRODUÇÃO DE ETANOL A PARTIR DE  
MELAÇO DE CANA-DE-AÇÚCAR PELA  
ADIÇÃO DE BENZOATO

L.E. GUTIERREZ<sup>1</sup>  
A.V.K.O. ANNICHINO<sup>1</sup>  
L. LUCATTI<sup>1</sup>  
S.B. LEITE DA SILVA<sup>1</sup>

---

**RESUMO:** O efeito da adição de benzoato de sódio sobre a fermentação alcoólica de meio de melaço de cana-de-açúcar com 15% de açúcares redutores totais foi estudado utilizando a levedura industrial *Saccharomyces cerevisiae* M-300-A. Foram adicionados 7,5 miligramas de benzoato de sódio para 0,8 gramas de levedura seca durante 0, 2, 4 e 6 ciclos fermentativos. Com a adição de benzoato ocorreu aumento na produção de etanol, redução do crescimento da levedura e dos teores de glicerol e dos álcoois n-propílico, isobutílico e isoamílico. O inibidor não provocou redução da viabilidade celular e após a retirada do inibidor a levedura voltou a apresentar crescimento. Este fato sugere a possibilidade do uso do benzoato em destilarias de álcool combustível.

Termos para Indexação: etanol, fermentação alcoólica, benzoato, melaço.

---

<sup>1</sup> Departamento de Química da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, 13400 - Piracicaba - SP e CEBTEC/FEALQ.

## ENHANCEMENT IN ETHANOL PRODUCTION FROM CANE MOLASSES BY BENZOATE ADDITION

**ABSTRACT:** The effect of the addition of sodium benzoate on alcoholic fermentation of molasses medium with 15% total reducing sugars was studied by using industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae* M-300-A. Sodium benzoate was added at the rate of 7.5 miligram to 0,8 grams of dry yeast during 0, 2, 4 e 6 fermentative cycles. The addition of sodium benzoate resulted in an increase in ethanol production and a reduction of yeast growth and glycerol and n-propylic, isobutylic and isoamylic alcoholic contents. The inhibitor did not reduce cell viability; soon after its removal the yeast returned to grow. This fact suggests the possibility of using the benzoate in distilleries.

Index Terms: ethanol, alcoholic fermentation, benzoate, molasses.

### INTRODUÇÃO

No Brasil, o etanol é uma fonte de energia alternativa que tem sido usada como combustível para automóveis desde 1979 com grande sucesso. Para melhorar o rendimento da fermentação etanólica e por conseguinte aumentar a produção de etanol, seleção e isolamento de leveduras que toleram altas temperaturas e alta concentração de açúcares tem sido feita (SANTOS, 1988; ERNANDES et alii, 1990).

Também foram estudadas as características da composição das leveduras. GIUDICI et alii (1983) relataram que uma correlação linear positiva entre o teor de ácido oleico e a produtividade de etanol em 22 linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, enquanto que WATSON (1982) relatou que células enriquecidas com ácidos graxos insaturados produziram altas concentrações de etanol. NAGAR-LEGMANN & MARGALITH

(1987) relataram que a levedura altamente fermentativa não apresentou ácidos graxos poliinsaturados como linoleico e linolênico. E também OHTA & HAYASHIDA (1983) verificaram que a adição de ergosterol e ácido oleico provocou aumento na produção de etanol durante a fermentação de "sake" além de reduzir o tempo da fermentação.

Outras possibilidades para se aumentar a produção de etanol foram relatadas como a adição de óleos vegetais (SAIGAL & VISHWANATHAN, 1983), ferrocianeto (ODERINDE et alii, 1986), leite desnatado (PATIL et alii, 1986) e óleo de soja (ALTERTHUM & CRUZ, 1987). Sendo que a adição de sais de magnésio (DOMBEK & INGRAM, 1986) e de cálcio (NABAIS et alii, 1988) melhoraram a tolerância das leveduras ao etanol durante a fermentação alcoólica e que a adição de ergosterol a mosto de uva aumentou a fermentação do açúcar em condições anaeróbicas (LARUE et alii, 1980).

Uma outra possibilidade de aumentar a produção de etanol é reduzir a formação de massa celular pelo uso de inibidores metabólicos (AMIM et alii, 1984; GUTIERREZ, 1989), mas infelizmente ocorre perda de viabilidade celular, o que impossibilita o uso no sistema atual de reciclagem de fermento utilizado no Brasil para a produção de etanol.

No presente trabalho um aumento significativo na produção de etanol a partir do melaço é apresentado pela adição de benzoato de sódio sem ocorrer perda de viabilidade celular.

## MATERIAL E MÉTODOS

Levedura: foi utilizada uma linhagem industrial de *Saccharomyces cerevisiae* M-300-A, fornecida pelo Departamento de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo. A levedura foi multi-

plicada anaerobicamente em meio de melaço com 3% de açúcares redutores totais, pH 5.0, suplementado com 150 ppm de nitrogênio amoniacal na forma de sulfato de amônio e 100 ppm de fósforo na forma de fosfato dibásico de potássio, e esterilizado a 121°C durante 20 minutos. A multiplicação foi realizada a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  durante 36 horas com agitação ocasional. A levedura foi centrifugada e lavada com água gelada. Foram colocados em cada tubo de fermentação 0,8 gramas de levedura com base na matéria seca.

Meio de melaço para fermentação: melaço de cana-de-açúcar da Usina MB do Estado de São Paulo, safra 89, foi diluído até 15% de açúcares redutores totais, pH acertado a 4.0 com solução de ácido sulfúrico e esterilizado a 121°C durante 20 minutos. O meio foi suplementado com 1,0 grama de sulfato de amônio e 0,55 gramas de fosfato dibásico de potássio por litro.

Ensaio de fermentação: foram realizados dois ensaios. No primeiro, 50 ml de meio de melaço com 15% de açúcares redutores totais contendo 150 ppm de benzoato de sódio foram adicionados ao fermento de uma só vez. No segundo, 20 ml de uma solução de 375 ppm de benzoato de sódio foram adicionados ao fermento e em seguida foram adicionados 10 ml de meio de melaço a 21% de açúcares redutores totais por hora até 50 ml. Nos dois ensaios a fermentação foi realizada a  $32 \pm 1^\circ\text{C}$  em frascos cilíndricos de 150 ml, em duplicata, e na presença do inibidor benzoato durante 0, 2, 4 e 6 primeiros ciclos de fermentação. Os frascos foram pesados de hora em hora para verificar a produção de gás carbônico e o final da fermentação. O tempo de fermentação foi de cerca de 8 horas nos dois ensaios. Após o final da fermentação, foram coletadas amostras para determinar a viabilidade celular e o meio fermentado foi centrifugu-

gado sendo o sobrenadante utilizado para as análises de etanol, glicerol, álcoois superiores e açúcares redutores residuais e a levedura foi reutilizada durante oito ciclos fermentativos.

### ANÁLISES

Viabilidade celular: foi determinada de acordo com PIERCE (1970) utilizando azul de metileno como indicador.

Etanol: foi determinado por densimetria segundo AMORIM et alii (1979).

Glicerol: foi analisados colorimetricamente segundo descrito em ZAGO et alii (1989).

Álcoois superiores: foram identificados e quantificados por cromatografia em fase gasosa (CG-17) como descrito em GUTIERREZ (1988).

Açúcares redutores: foram determinados pelo método de Somogyi-Nelson adaptado por AMORIM et alii (1982).

Análise estatística: foi adotado o delineamento inteiramente casualizado com oito repetições segundo GOMES (1970).

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Na Tabela 1 é apresentado o efeito da adição do inibidor benzoato junto com a adição do meio de melaço de uma única vez. Com a adição do benzoato durante os dois primeiros ciclos (tratamento B) já ocorreu aumento não significativo ( $p > 0,05$ ) na produção de etanol e redução significativa ( $p < 0,05$ ) no teor de glicerol e no peso úmido do fermento sem ocorrer alteração significativa na viabilidade

Tabela 1 - Efeito do benzoato de sódio com adição única do meio de melação com 15% de ART sobre a fermentação alcoólica (médias de 8 ciclos fermentativos).

COMPONENTES	TRATAMENTOS*					
	A	B	C	D	C.V.	dms 5%
Etanol (% vol.)	7,80	7,95	8,07	8,12	2,56	0,205
Glicerol (g/100 ml)	0,76	0,70	0,66	0,63	6,12	0,042
Peso úmi- do (g)	7,79	7,05	6,75	6,57	5,35	0,379
Viabili- dade (%)	95,85	95,45	95,91	94,71	3,93	5,113
N-Propí- lico (mg/l)	50,6	36,8	26,7	19,3	27,59	9,269
Isobutí- lico (mg/l)	54,3	48,7	47,3	39,3	22,16	10,569
Isoamí- lico (mg/l)	79,5	71,2	61,2	52,7	13,80	9,182

\* Tratamentos: A (sem inibidor)  
 B (inibidor nos dois primeiros ciclos)  
 C (inibidor nos quatro primeiros)  
 D (inibidor nos seis primeiros)

celular. Com a adição do benzoato nos quatro ciclos iniciais (tratamento C) e seis ciclos (tratamento D) ocorreram aumentos significativos ( $p < 0,05$ ) na produção de etanol e reduções significativas ( $p < 0,05$ ) nos teores de glicerol, álcoois n-propílico, isobutílico e isoamílico e no peso úmido do fermento. Em todos os tratamentos com adição de benzoato não ocorreu redução significativa ( $p < 0,05$ ) na viabilidade celular. Comparando-se os tratamentos C e D não se observa aumento significativo na produção de etanol e redução significativa nos teores de glicerol e do peso úmido.

Na Tabela 2 são apresentados os teores de etanol, glicerol, álcoois n-propílico, isobutílico e isoamílico, o peso úmido do fermento e a viabilidade celular de fermentações com adição inicial do inibidor benzoato e adição parcelada do meio com 10 ml por hora até 50 ml. Com apenas duas adições do inibidor (tratamento B) ocorreu aumento da produção de etanol embora não significativa ( $p > 0,05$ ), porém ocorreu redução significativa na formação de glicerol, do peso úmido do fermento e do álcool n-propílico sem alterar significativamente a viabilidade celular. Com a adição de inibidor nos quatro primeiros ciclos (tratamento C) ocorreram aumentos significativos ( $p < 0,05$ ) na produção de etanol e redução no glicerol, peso úmido e nos álcoois n-propílico, isobutílico e isoamílico, não se observando efeitos sobre a viabilidade celular.

Não se observa na Tabela 2 efeito benéfico significativo com o aumento do número de ciclos de benzoato de quatro (tratamento C) para seis (tratamento D).

Comparando-se os dados das Tabelas 1 e 2 observa-se uma nítida vantagem da adição parcelada do meio sobre a adição única tanto no tratamento testemunha como com inibidor. Ocorreu maior produção de etanol e do crescimento do fermento com menor formação de glicerol.

Tabela 2 - Efeito do benzoato de sódio com adição parcelada de meio de melaço sobre a fermentação alcoólica. (Média de 8 ciclos fermentativos).

COMPONENTES	TRATAMENTOS*					
	A	B	C	D	C.V.	dms 5%
Etanol (% vol.)	8,13	8,27	8,36	8,38	2,83	0,219
Glicerol (g/100 ml)	0,58	0,50	0,46	0,43	8,00	0,037
Peso úmido (g)	9,80	8,14	7,82	7,68	10,96	0,857
Viabilidade (%)	93,15	96,66	96,82	96,52	3,75	3,618
N-Propílico (mg/l)	42,5	29,0	21,4	17,6	23,44	6,058
Isobutílico (mg/l)	41,7	37,7	35,0	28,8	14,39	4,818
Isoamílico (mg/l)	80,4	71,5	65,2	52,5	13,88	8,749

\* Tratamentos: A (sem inibidor)

B (inibidor nos dois primeiros ciclos)

C (inibidor nos quatro primeiros)

D (inibidor nos seis primeiros)



O efeito do benzoato sobre o crescimento da levedura em oito ciclos fermentativos pode ser visto na Figura 1. Com a adição do inibidor nos dois primeiros ciclos ocorreu redução do peso úmido do fermento e o efeito prolonga-se por mais dois ciclos e a partir do 5º ciclo iniciou-se uma recuperação do fermento atingindo um máximo no 8º ciclo. Fenômeno semelhante se repetiu com os tratamentos com adição nos 4 e 6 primeiros ciclos, demonstrando que o inibidor se acumula na levedura ou apresenta um efeito prolongado sobre o metabolismo da levedura.

A formação de glicerol é afetada pela adição do benzoato durante os 8 ciclos fermentativos como pode ser visto na Figura 3. Ocorre redução de glicerol com a adição do inibidor, porém, retirando-se o inibidor, o teor de glicerol torna a aumentar.

Comparando-se as Figuras 1, 2 e 3 pode ser observado que, com a diminuição do glicerol e do peso úmido ocorre maior produção de etanol. Em relação ao etanol (Figura 2), nota-se que mesmo após a retirada do inibidor a produção de etanol continua maior do que a testemunha.

Nas Figuras 4 e 5 pode-se observar o efeito do benzoato sobre a produção dos álcoois n-propílico e isoamílico, respectivamente. Ocorre redução desses álcoois enquanto a presença do inibidor. Retirando-se o inibidor a produção aumenta e atinge valores próximos da testemunha.

O benzoato é um preservativo de largo uso sendo mais efetivo contra leveduras do que bactérias, sendo a ação germicida devido à parte não dissociada da molécula, o que explica o maior poder em meio ácido (DESROSIER, 1970). No caso de ser utilizado nas fermentações alcoólicas é uma vantagem pois após o tratamento ácido do fermento, o pH do início da fermentação é normalmente baixo.

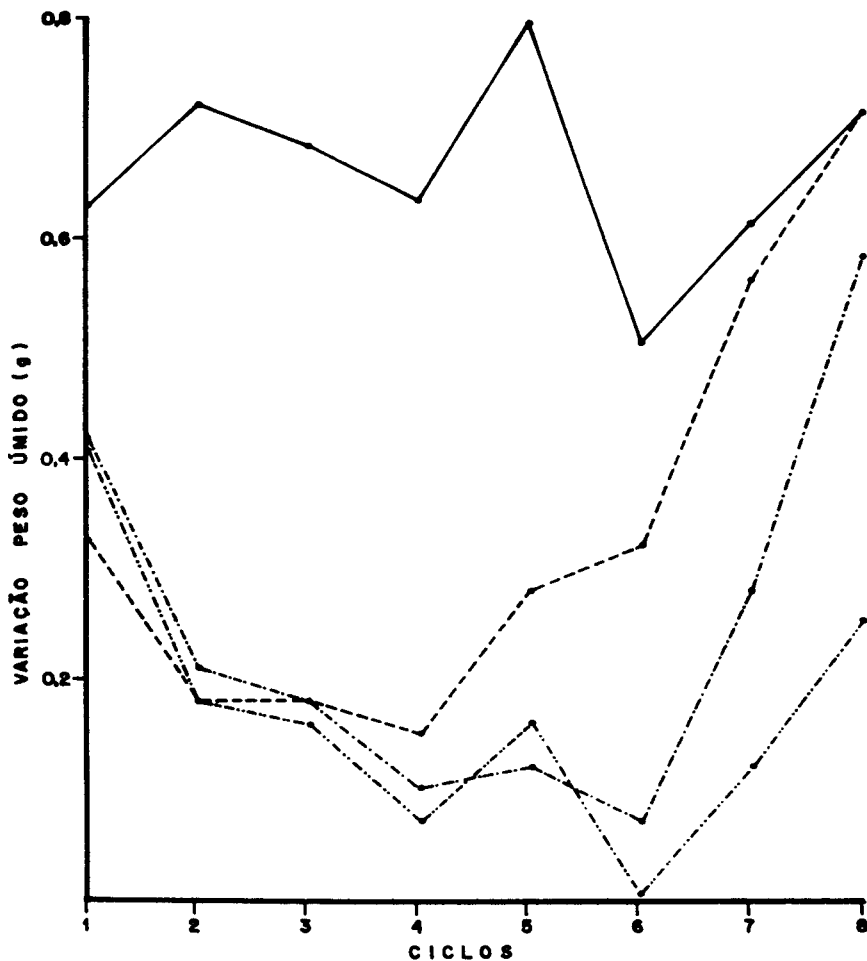


FIGURA 4 : EFEITO DO BENZOATO DE SÓDIO SOBRE O PESO ÚMIDO DO FERMENTO EM 8 CICLOS FERMENTATIVOS ( ADIÇÃO PARCELADA DO MEIO )  
— SEM INIBIDOR ; - - - INIBIDOR NOS 2 PRIMEIROS CICLOS ;  
- · - · INIBIDOR NOS 4 PRIMEIROS ; · · · · INIBIDOR NOS 6 PRIMEIROS.

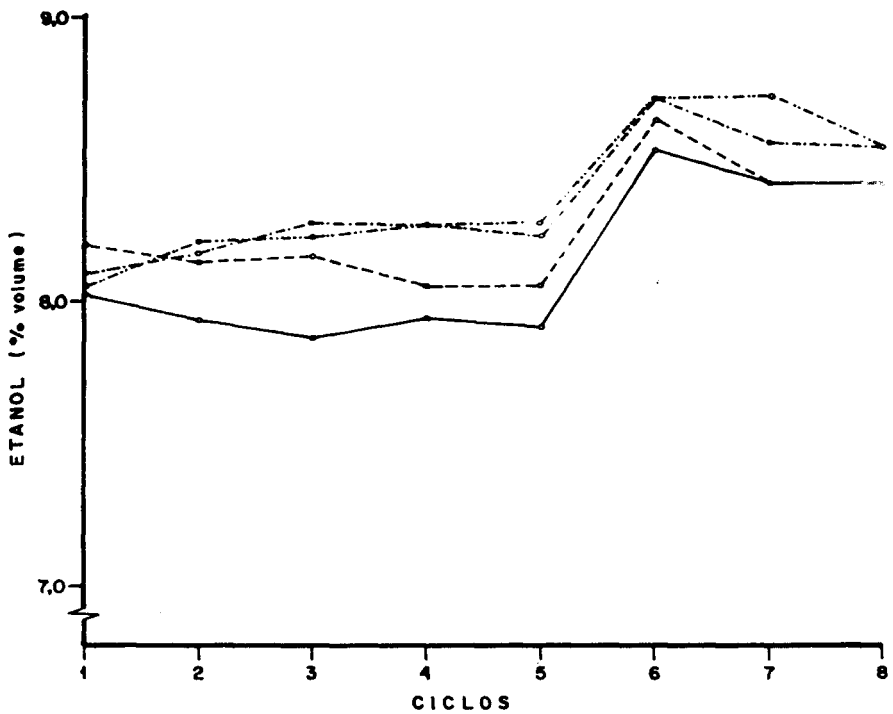


FIGURA 2 : EFEITO DO BENZOATO SOBRE A PRODUÇÃO DE ETANOL EM 8 CICLOS FERMENTATIVOS ( COM ADIÇÃO PARCELADA ) — SEM INIBIDOR ; ---- INIBIDOR NOS 2 PRIMEIROS CICLOS ; -.-.- INIBIDOR NOS 4 PRIMEIROS ; ..... INIBIDOR NOS 6 PRIMEIROS.

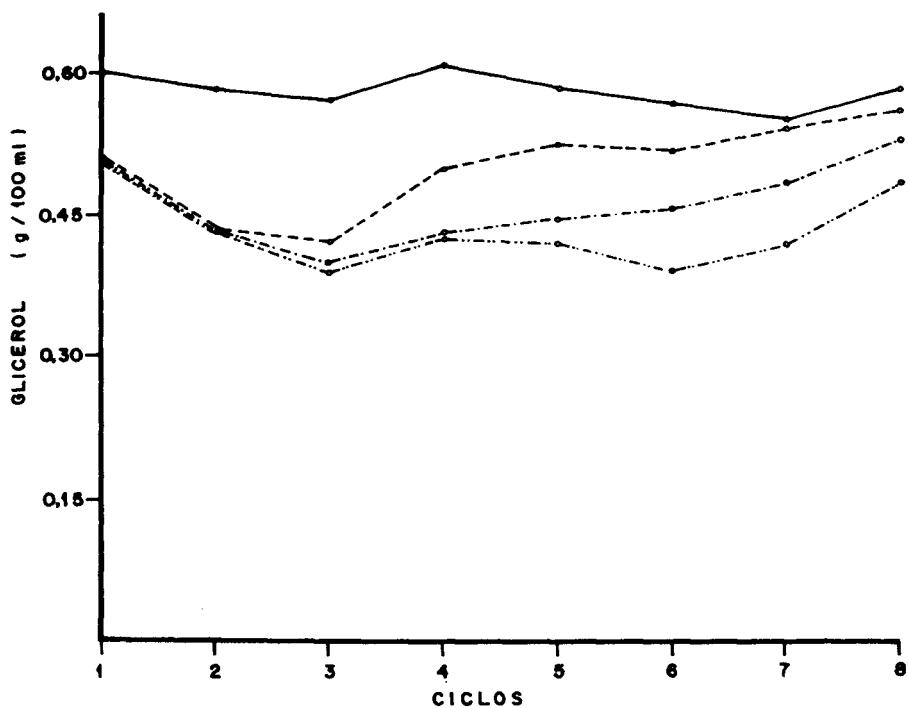


FIGURA 3 : EFEITO DO BENZOATO DE SÓDIO SOBRE A FORMAÇÃO DE GLICEROL EM 8 CICLOS FERMENTATIVOS (ADIÇÃO PARCELADA DO MEIO)  
— SEM INIBIDOR; ---- INIBIDOR NOS 2 PRIMEIROS CICLOS;  
- · - · - INIBIDOR NOS 4 PRIMEIROS; · · · · · INIBIDOR NOS 6 PRIMEIROS.

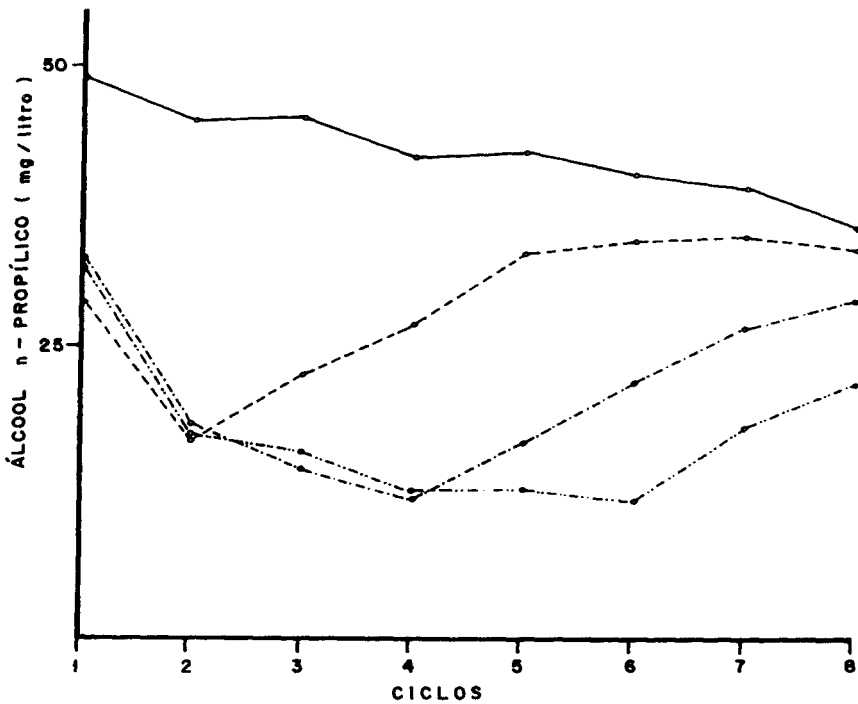


FIGURA 4 : EFEITO DO BENZOATO DE SÓDIO SOBRE A PRODUÇÃO DE ÁLCOOL n - PROPÍLICO EM 8 CICLOS FERMENTATIVOS ( ADIÇÃO PARCELADA DO MEIO ) — SEM INIBIDOR ; - - - - INIBIDOR NOS 2 PRIMEIROS CICLOS ; - · - · INIBIDOR NOS 4 PRIMEIROS ; · · · · INIBIDOR NOS 6 PRIMEIROS .

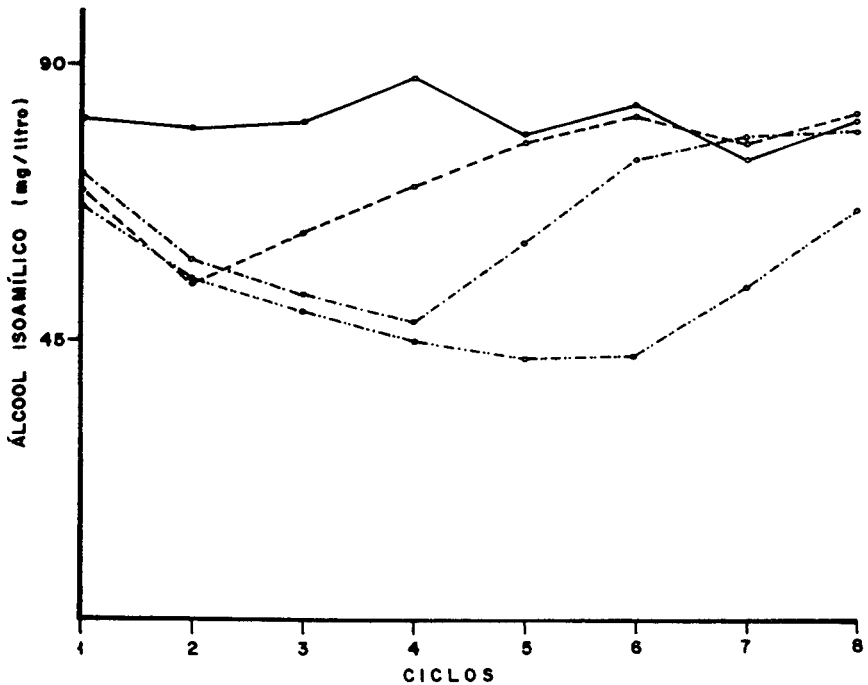


FIGURA 5: EFEITO DO BENZOATO DE SÓDIO SOBRE A PRODUÇÃO DE ALCÓOL ISOAMÍLICO EM 8 CICLOS FERMENTATIVOS (ADIÇÃO PARCELADA DO MEIO) — SEM INIBIDOR ; --- INIBIDOR NOS 2 PRIMEIROS CICLOS ; - · - · INIBIDOR NOS 4 PRIMEIROS ; · · · · INIBIDOR NOS 6 PRIMEIROS.

NORDSTROM (1966 e 1968) relatou que a formação de glicerol é dependente do crescimento da levedura, demonstrando que 0,69 gramas de glicerol são formados por grama de matéria seca produzida pela levedura. Nas Tabelas 1 e 2 pode-se observar uma queda do teor de glicerol que acompanha a redução do peso úmido do fermento evidenciando a relação entre glicerol e crescimento da levedura. A levedura reduzindo o crescimento e a produção de glicerol passa a produzir maior quantidade de etanol confirmando observações de GUTIERREZ (1989).

A síntese de glicerol também está relacionada com a formação de ácido succínico; com a redução da formação desse ácido ocorre redução na produção de glicerol e aumento na produção de etanol (OURA, 1977). Os precursores para a síntese do ácido succínico pela via oxidativa são o ácido oxaloacético e acetil-coenzima-A. A formação do ácido oxaloacético é realizada pela piruvato carboxilase, enzima que é ativada por acetil-coenzima-A (PALACIAN et alii, 1966; CAZZULO & STOPANI, 1968). Dessa forma a redução do nível de acetil-coenzima-A deve ser acompanhada por redução do ácido succínico e do glicerol. GRIFFITH et alii (1989) relataram que benzoato compete com acetato pela formação de éster de coenzima-A e assim reduzindo o nível de acetil-coenzima-A formada e portanto a atividade da piruvato carboxilase. Uma outra enzima inibida por benzoato é a tirosinase do cogumelo *Agaricus bisporus* (MENON et alii, 1990). No presente trabalho foi apresentado nas Tabelas 1 e 2 e na Figura 5, uma redução na produção de álcool isoamílico com a adição de benzoato. Este fato vem confirmar a menor formação de acetil-coenzima-A com o uso do inibidor pois para a síntese de ácido alfacetoisocaprílico (precursor da leucina e do álcool isoamílico) é necessário acetil-coenzima-A (LEHNINGER, 1970). Da mesma forma, ocorreu redução no álcool n-propílico

(Figura 4), provavelmente devido à menor formação do ácido oxaloacético pela piruvato carboxilase e portanto, menor produção de ácido aspártico, que, ao lado da glicina, é um dos precursores da treonina e do álcool n-propílico.

A redução na produção de álcoois superiores pode ser uma outra vantagem com o uso do benzoato na fermentação alcoólica, pois possibilita a obtenção de etanol de maior pureza, embora reduza a produção de óleo fusel.

Outros inibidores como 2,4-dinitrofenol também reduzem ácido succínico (DURO & SERRANO, 1981), a produção de matéria seca da levedura e o teor de glicerol durante a fermentação alcoólica (AMIN et alii, 1985; GUTIERREZ, 1989). Porém, nesses trabalhos também ocorreu diminuição da viabilidade celular das leveduras, provavelmente porque o 2,4-dinitrofenol afeta a síntese de ATP nas células das leveduras, o que não ocorre com o benzoato. Assim, embora a produção de etanol seja maior, o inibidor 2,4-dinitrofenol não pode ser usado num sistema de reciclo de fermento como é usado nas destilarias brasileiras.

### CONCLUSÃO

A adição de benzoato durante a fermentação alcoólica provocou maior formação de etanol, redução do crescimento da levedura e menor produção de glicerol e de álcoois superiores sem afetar a viabilidade celular.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTERTHUM, F. & CRUZ, M.R.M. Aumento do rendimento da fermentação alcoólica pela adição de óleo de soja. Revista de Microbiologia, São Paulo, 18 (1): 52-7, 1987.
- AMIN, G.; P. STANDAERT & H. VERACHTERT. Effects of metabolic inhibitors on the alcoholic fermentation by several yeasts in batch or in immobilized cell systems. Applied Microbiology, Berlin, 19: 91-9, 1984.
- AMORIM, H.V.; ZAGO, E.A.; GUTIERREZ, L.E. Método rápido para o controle da fermentação e destilação. Saccharum STAB, São Paulo, 4: 31-43, 1979.
- AMORIM, H.V.; ZAGO, E.A.; OLIVEIRA, A.J. Novos métodos para o controle da fermentação alcoólica. São Paulo, Sociada de Brasileira de Microbiologia, 1982. 58p.
- CAZZULO, J.J. & STOPPANI, A.O.M. The regulation of yeast pyruvate carboxylase by acetyl-coenzyme-A and L-aspartate. Archive of Biochemistry and Biophysics, New York, 127: 563-7, 1968.
- DESROSIER, N.W. The technology of food preservation. Westport, AVI, 1970. 493p.
- DOMBEK, K.M. & INGRAM, L.O. Magnesium limitation and its role in apparent toxicity of ethanol during yeast fermentation. Applied and Environmental Microbiology, Baltimore, 52:975-81, 1986.

- DURO, A.F. & SERRANO, R. Inhibition of succinate production during yeast fermentation by deenergization of the plasma membrane. Current Microbiology, New York, 6: 111-3, 1981.
- ERNANDES, J.R.; MATULIONIS, M.; CRUZ, S.H.; BERTOLINI, M.C.; LALUCE, C. Isolation of new ethanol-tolerant yeasts for fuel ethanol production from sucrose. Biotechnology Letters, Kew, 12 (6): 463-8, 1990.
- GIUDICI, P.; GUERZONI, M.E.; CONTE, L. Relationship of cellular fatty acid composition to the ethanol productivity in Saccharomyces cerevisiae. Vini D'Italia, 25: (145):147-53, 1983.
- GOMES, F.P. Curso de Estatística Experimental São Paulo, Nobel, 1970. 485p.
- GRIFFITH, A. D.; CYR, D.M.; EGAN, S.G.; TREMBLAY, C.C. Inhibition of pyruvate carboxylase by sequestration of coenzyme A with sodium benzoate. Archives of Biochemistry and Biophysics. San Diego, 269 (1): 201-7, 1989.
- GUTIERREZ, L.E. Efeito dos ácidos fórmico e propiônico sobre a produção de álcoois superiores durante a fermentação alcoólica Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Piracicaba, 45 (2):369-379, 1988.
- GUTIERREZ, L.E. Estudo comparativo da fermentação alcoólica por linhagens de Saccharomyces cerevisiae e Saccharomyces uvarum. Piracicaba, 1989. 160p. (Livro-Docência - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

- LARUE, F.; LAFON-LAFOURCADE, S.; GAYON, P.R. Relationship between the sterol content of yeast cells and their fermentation activity in grape must. Applied and Environmental Microbiology, Baltimore, 39 (4): 808-11, 1980.
- LEHNINGER, A.L. Biochemistry. New York, Worth, 1970. 833p.
- MENON, S.; FLECK, R.W.; YONG, G.; STROTHKAMP, K.G. Benzoic acid inhibition of the alpha, beta and gama isozymes of *Agaricus bisporus* tyrosinase. Archives of Biochemistry and Biophysics, New York, 280 (1): 27-32. 1990.
- NABAIS, R.C.; CORREIA, I.S.; VIEGAS, C.A.; NOVAIS, J.M. Influence of calcium ion on ethanol tolerance of *Saccharomyces bayanus* and alcoholic fermentation by yeast. Applied and Environmental Microbiology, Baltimore, 54 (10): 2439-46, 1988.
- NAGAR-LEGMANN, R.; MARGALITH, P. A comparative study of the lipid composition of yeasts with different fermentative capacities. Applied Microbiology and Biotechnology, Berlin, 26:49-54, 1987.
- NORDSTROM, K. Yeast growth and glycerol formation. Acta Chemica Scandinavica, Copenhagen, 20 (4). 1016-25, 1966.
- NORDSTROM, K. Yeast growth and glycerol formation. II. Carbon and redox balances. Journal of the Institute of Brewing, London, 74: 429-32, 1968.

- ODERINE, R.A.; NGOKA, L.C.; ADESOGAN, E.K. Comparative study of the effect of ferrocyanide and EDTA on the production of ethyl alcohol from molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering, New York, 28: 1462-5, 1986.
- OHTA, K. & HAYASHIDA, S. Role of tween 80 and monoolein in a lipid-sterol-protein complex which enhances ethanol tolerance os sake yeasts. Applied and Environmental Microbiology, Baltimore, 46(4):824-5,1983.
- OURA, E. Reaction products of yeast fermentations. Process Biochemistry, Rickmansworth, 12: 19-35, 1977.
- PALACIAN, E.; TORRONTEGUI, G.; LOSADA, M. Inhibition of yeast pyruvate carboxylase by L-aspartate and oxaloacetate. Biochemical and Biophysical Research Communications, San Diego, 24 (5): 644-9, 1966.
- PATIL, S.G.; GOKHALE, D.V.; PATIL, B.G. Enhancement in ethanol production from cane molaasses by skim milk supplementation. Enzyme and Microbial Tecnology, Guildford, 8 : 481-4, 1986.
- PIERCE, J.S. Institute of Brewing: analysis committee measurement of yeast viability. Journal of the Institute of Brewing. London, 76 (5):442-3, 1970.
- SAIGAL, D. & VISWANATHAN, L. Effect of oils and fatty acids on the tolerance of distiller's yeast to alcohol and temperature. International Sugar Journal, Port Talbot, 85 (1017): 266-9, 1983.

- SANTOS, M. N. G. Seleção de leveduras termotolerantes para a produção de etanol. Viçosa, 1988. (Dissertação - Universidade Federal de Viçosa).
- WATSON, K. Unsaturated fatty acid but not ergosterol is essential for high ethanol production in *Saccharomyces*. Biotecnology Letters, Kew, 4 (6): 197-402, 1982.
- ZAGO, E.A.; AMORIM, H.V.; BASSO, L.C.; GUTIERREZ, L.E.; OLIVEIRA, A.J. Métodos analíticos para o controle da produção de etanol. Piracicaba, ESALQ, Centro de Biotecnologia Agrícola, 1989, 144p.